

T.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
2021-YL-074

**FARKLI SAKIZ AĞACI (*Pistacia lentiscus* L.)  
GENOTİPLERİNE AİT SÜRGÜN UCU EKSPANTLARINDA  
İN VİTRO KÜLTÜRLERİN BAŞLATILMASI VE  
MİKROÇOĞALTIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

MAZLUM UMUT KILIÇ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi HÜSEYİN UYSAL

Bu tez, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından ZRF-20036 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN - 2021

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Hocam Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Uysal'a ve çalışmamda kullandığım temel bitkisel materyallerin temininde bana yardımcı olan Çeşme İlçe Tarım ve Orman Müdürü Ahmet Keçeci'ye teşekkürlerimi sunarım.

Mazlum Umut Kılıç

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
ÖZET .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	11
3.1. Materyal .....	11
3.2. Yöntem.....	12
3.2.1. Eksplant Kaynağının Hazırlanması.....	12
3.2.2. Besi Ortamlarının Hazırlanması.....	12
3.2.3. Başlangıç Dikim Uygulamaları ve Sterilizasyon .....	13
3.2.4. Sürgün Proliferasyonu.....	15
3.2.5. Köklendirme ve Adaptasyon.....	16
3.3 Araştırmada İncelenen Konular .....	16
3.4. Verilerin Analizi .....	16
4. BULGULAR .....	17
4.1. Çelik Alınan Dönem ve Genotipin Taze Sürgün Ucu Elde Etmeye Etkisi.....	17
4.2. Eksplantlardaki Enfeksiyon ve Kontaminasyon Durumu.....	18

4.3. Kararmaya Yönelik Uygulamalar ile Çelik Alınan Dönem ve Genotipin Kararmaya Etkisi .....	19
4.4. Alt Kültür İşlemleri.....	22
4.5. Başlangıç Uygulamaları ile Çelik Alınan Dönem ve Genotipin Sürgün Gelişimi, Sürgün Oluşumu Üzerine Etkisi .....	23
4.6. Çelik Alınan Dönem ve Genotipin Köklenme ve Kallus Oluşumu Üzerine Etkisi .....	26
5. TARTIŞMA.....	29
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	34
KAYNAKLAR.....	36
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	45
ÖZ GEÇMİŞ.....	46

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>2,4-D</b>	: 2,4-Diklorofenoksiasetik asit
<b>2iP</b>	: 2-İzopentenil adenin
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	: Gümüş nitrat
<b>AgNP</b>	: Gümüş nanopartikülleri
<b>AK</b>	: Aktif karbon
<b>ANOVA</b>	: Analysis of variance
<b>BAP</b>	: 6-benzilaminopürin
<b>B.U.</b>	: Başlangıç Uygulaması
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum klorür
<b>CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O</b>	: Kalsiyum klorür dihidrat
<b>cm</b>	: santimetre
<b>CMGA</b>	: Chios Mastiha Growers Association
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	: Kobalt klorür
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	: Kobalt (II) klorür heksahidrat
<b>CuNO<sub>3</sub></b>	: Bakır nitrat
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	: Bakır (II) sülfat pentahidrat
<b>D</b>	: Doğu
<b>dk</b>	: dakika
<b>DKW</b>	: Driver & Kuniyuki Walnut
<b>E.B.D.T.S.</b>	: Eksplant başına düşen tomurcuk sayısı
<b>Fe</b>	: Demir (element)

<b>FeEDDHA</b>	: Etilen diamin di-2-hidroksifenil asetat ferrik
<b>FeEDTA</b>	: Ferrik etilen diamin tetra asetik asit
<b>FeNaEDTA</b>	: Ferrik sodium etilen diamin tetra asetik asit
<b>g</b>	: gram
<b>G.</b>	: Genotipler
<b>G1</b>	: Genotip 1
<b>G2</b>	: Genotip 2
<b>G3</b>	: Genotip 3
<b>G4</b>	: Genotip 4
<b>GA<sub>3</sub></b>	: Giberellik asit
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	: Borik asit
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>HgCl<sub>2</sub></b>	: Civa klorür
<b>IBA</b>	: İndol-3-bütirik asit
<b>IRAP</b>	: İnter-retrotransposon amplified polymorphism
<b>K</b>	: Kuzey
<b>K.E.S.</b>	: Köklenen eksplant sayısı
<b>KI</b>	: Potasyum iyodür
<b>K-IBA</b>	: İndol-3-bütirik asit potasyum tuzu
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Mono potasyum fosfat
<b>KNO<sub>3</sub></b>	: Potasyum nitrat
<b>K.O.E.S.</b>	: Kallus oluşturan eksplant sayısı

<b>l</b>	: litre
<b>m</b>	: metre
<b>mg</b>	: miligram
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	: Magnezyum sülfat
<b>MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	: Mangan (II) sülfat monohidrat
<b>MS</b>	: Murashige & Skoog
<b>NAA</b>	: Naftalen asetik asit
<b>Na-Alg</b>	: Sodyum aljinat
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	: Sodyum molibdat dihidrat
<b>NaOCl</b>	: Sodyum hipoklorit
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	: Amonyum nitrat
<b>OGM</b>	: Orman Genel Müdürlüğü
<b>O.K.S.</b>	: Ortalama kök sayısı
<b>Ort.</b>	: Ortalaması
<b>O.T.S.</b>	: Oluşan tomurcuk sayısı
<b>PAL</b>	: fenilalanin amonyum liyaz
<b>PbNO<sub>3</sub></b>	: Kurşun nitrat
<b>pH</b>	: Power of hydrogen
<b>PIC</b>	: Polymorphism information content
<b>POD</b>	: Peroksidaz
<b>ppm</b>	: parts per million (milyonda bir)
<b>PPO</b>	: Polifenol oksidaz

- rpm** : Revolutions per minute (bir dakika içerisinde gerçekleştirilen dönüş / devir sayısı)
- $\Sigma$  : Sigma (“Toplam” anlamındadır.)
- S.G.G.E.S.** : Sürgün gelişimi gösteren eksplant sayısı
- SPSS** : Statistical package for the social sciences
- UNESCO** : United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (Birleşmiş Milletler Eğitim, Bilim ve Kültür Örgütü)
- T.E.S.** : Toplam eksplant sayısı
- T.K.S.** : Toplam kök sayısı
- T.O.E.S.** : Tomurcuk oluşturan eksplant sayısı
- ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O** : Çinko sülfat heptahidrat
- WP** : Islanabilir toz
- WPM** : Woody plant medium
- μM** : mikromolar
- %K.O.** : % Kallus oluşumu
- %Kök.O.** : % Köklenme oranı
- %S.G.G.E.O.** : % Sürgün gelişimi gösteren eksplant oranı
- %T.O.E.O.** : % Tomurcuk oluşturan eksplant oranı
- °C** : Derece Celsius
- °** : Derece
- ‘** : Dakika
- “** : Saniye
- +** : Birinci derece alt kültür



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 4.1.</b> Süren çelik başına elde edilen eksplant (sürgün ucu) sayısındaki değişimler (adet). .....	18
<b>Şekil 4.2.</b> Farklı dönem ve genotiplerde ikinci aşama alt kültürlere alınan eksplant sayısındaki değişimler (adet). .....	23
<b>Şekil 4.3.</b> Farklı genotiplerde tomurcuk oluşturan eksplant oranları (%) .....	25

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.1.</b> Sakız ağacında gövde ve doğal açıklıklardan salınan reçinenin görünümü .....	2
<b>Resim 3.1.</b> Çalışmada kullanılan genotiplere ait yaprak görünümleri. ....	11
<b>Resim 4.1.</b> Sakız ağacı çeliği üzerinde gelişen sürgünler. ....	18
<b>Resim 4.2.</b> Orta şiddette kararma gösteren eksplantlar.....	19
<b>Resim 4.3.</b> Parafin uygulanmış (solda) ve uygulanmamış (sağda) eksplantların ortamı kirlenme dereceleri. ....	21
<b>Resim 4.4.</b> Yaprak ve sürgün uçlarında görülen fizyolojik bozukluklar. ....	21
<b>Resim 4.5.</b> Eksplantlarda gözlemlenen sürgün gelişimi (sol) ve tomurcuk oluşumları (orta ve sağ). ....	25
<b>Resim 4.6.</b> Eksplant gövdeleri üzerinde meydana gelen kallus oluşumları.....	27
<b>Resim 4.7.</b> Köklenmiş olgun sakız ağacı eksplantlarına ait yandan (solda) ve alttan (sağda) görünüm.....	27

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> Araştırmada kullanılan MS besi ortamının içeriği ve kullanılan türevleri .....	13
<b>Çizelge 4.1.</b> Çeliklerin farklı dönem ve genotiplerde sürgün oluşturma performansları.....	17
<b>Çizelge 4.2.</b> İn vitro ortamlarda karşılaşılan enfeksiyon oranları.....	19
<b>Çizelge 4.3.</b> Eksplantlarda gözlemlenen kararma şiddetleri.....	20
<b>Çizelge 4.4.</b> Dönem ve genotipin kararmaya etkisine dair varyans analizi test sonuçları .....	22
<b>Çizelge 4.5.</b> Alt kültüre alınan eksplant sayıları .....	23
<b>Çizelge 4.6.</b> Eksplantların sürgün geliştirme ve tomurcuk oluşturma performansları .....	24
<b>Çizelge 4.7.</b> Tomurcuk oluşumlarına dair Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları .....	26
<b>Çizelge 4.8.</b> Tomurcuk oluşumlarına dair varyans analiz sonuçları.....	26
<b>Çizelge 4.9.</b> Genotiplerin kallus ve kök oluşturma yüzdeleri ile Duncan testi sonuçları .....	28
<b>Çizelge 4.10.</b> Kallus ve kök oluşumlarına dair varyans analiz sonuçları .....	28

## ÖZET

### FARKLI SAKIZ AĞACI (*Pistacia lentiscus* L.) GENOTİPLERİNE AİT SÜRGÜN UCU EKSPANTLARINDA İN VİTRO KÜLTÜRLERİN BAŞLATILMASI VE MİKROÇOĞALTIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Kılıç M. U. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019.

**Amaç:** Bu çalışma, olgun sakız ağaçlarının (*Pistacia lentiscus* L.) in vitro klonal mikroçoğaltımını gerçekleştirmek amacıyla yapılmıştır. Ayrıca kültür ortamlarında meydana gelen kararma problemleri, farklı örnek alım dönemleri ve genotiplerin başarısı araştırılmıştır.

**Materyal ve Yöntem:** Çalışmada başlangıç bitki materyali olarak 4 farklı genotipe ait yaklaşık 20-25 cm'lik 1-2 yıllık odun çelikleri kullanılmıştır. Örnekler; Kasım, Aralık ve Ocak aylarında alınmıştır. Çeliklerin saf suda zorlanmasıyla elde edilen sürgün uçları, doku kültüründe eksplant olarak kullanılmıştır.

**Bulgular:** Tüm genotiplerin ortalaması alındığında, çelik başına düşen ortalama sürgün değeri 6,57 ile Ocak ayında en yüksek seviyede bulunmuştur. Eksplantların dip kısımlarını kaplayan parafin uygulamasının, kararmayı belirgin şekilde azalttığı hatta neredeyse tamamen engellediği gözlemlenmiştir. Ocak döneminin ikinci aşamasında 1 mg/l BAP (6-benzilaminopürin) ve 0,5 mg/l GA<sub>3</sub> (giberellik asit) içerikli MS besi ortamlarında eksplantların %51,33'ü adventif tomurcuk oluşturmuştur. Yabani genotipe ait eksplantlar, 2 mg/l IBA (indol-3 bütirik asit) içerikli MS besi ortamında %61,54 oranında köklenme göstermiştir.

**Sonuç:** Yabani genotipte sağlanan köklenme başarısı, kültür klonlarına ait sürgün uçlarının, akraba türler yerine köklendirilmiş yabani genotip eksplantları üzerine mikroaşılmasının mümkün olduğunu göstermektedir. Geliştirildiği takdirde bu yöntem, sakız ağaçlarının ticari mikroçoğaltımı için en makul metod olarak ön plana çıkmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Sakız, *Pistacia*, Çelik, Mikroçoğaltım, Kararma

## ABSTRACT

### ESTABLISHMENT OF IN VITRO CULTURES AND INVESTIGATION OF MICROPROPAGATION POSSIBILITIES IN SHOOT TIP EXPLANTS OF DIFFERENT MASTIC TREE (*Pistacia lentiscus* L.) GENOTYPES

**Kılıç M. U. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Agricultural Biotechnology Program, Master Thesis, Aydın, 2019.**

**Objective:** The aim of this study was to perform in vitro clonal micropropagation of mature mastic trees (*Pistacia lentiscus* L.). In addition, browning problems in culture media, different sampling periods and success of genotypes were investigated.

**Material and Methods:** In the study, 1–2-year-old wood cuttings which are approximately 20-25 cm belonging to 4 different genotypes were used as the starting plant material. Samples were taken in November, December and January. The shoot tips obtained by forcing the hardwood cuttings in distilled water were used as explants in tissue culture.

**Results:** When all genotypes are averaged, the average shoot value per cutting was found at the highest level in January with 6.57. The application of paraffin, which covers the basal parts of the explants, significantly reduced or even completely prevented browning. In the second stage of the January period, 51.33% of the explants formed adventitious buds in MS media containing 1 mg/l BAP (6-benzylaminopurine) and 0,5 mg/l GA<sub>3</sub> (giberellic acid). Explants of wild genotype showed 61.54% rooting in MS medium containing 2 mg/l IBA (indole-3-butyric acid).

**Conclusion:** The rooting success achieved in the wild genotype indicates that it is possible to micrograft shoot tips of culture clones onto rooted wild genotype explants rather than related species. If it was further developed, this method would stand out as the most reasonable method for commercial micropropagation of mastic trees.

**Keywords:** Mastic, *Pistacia*, Cutting, Micropropagation, Browning

# 1. GİRİŞ

Bilimsel adıyla *Pistacia lentiscus* L. (sakız ağacı), Anacardiaceae familyasının *Pistacia* cinsine mensuptur. *Pistacia* cinsinin diğer üyeleri *P. atlantica* Desf. (atlantik sakızı), *P. terebinthus* L. (menengiç), *P. vera* L. (antep fıstığı), *P. khinjuk* Stocks (buttum) gibi türlerle akraba olup her dem yeşil olması ve *Lentiscella* seksiyonunda yer almasıyla onlardan ayrılır. Önceleri *P. lentiscus*, *Lentiscus* adıyla farklı bir cins olarak düşünülmüş ancak Carl Linnaeus tarafından *Pistacia* cinsi dahilinde değerlendirilmiştir (Zohary, 1952). Değerli reçinesi için kültüre alınan, ekonomik yetiştiriciliğin yapıldığı sakız ağaçları (*Pistacia lentiscus* L. var. *chia* Duham.), literatüre *Pistacia lentiscus*'un bir varyetesi olarak geçse de bazı botanikçi ve dendrologlar tarafından bir kültivar (kültür varyete) olduğu yönünde görüş bildirilmiştir (Browicz, 1987). Sakız ağaçları, Doğu Akdeniz'den Kanarya Adaları'na kadar tüm Akdeniz kıyılarında yayılış göstermektedir (Al-Saghir ve Porter, 2012). Kuraklığa ve tuzluluğa dayanıklı yapısıyla maki vejetasyonunun önemli bir üyesi konumundadır (Boztok, 2007) ve tipik bir kıyı Akdeniz iklimi bitkisidir. Sakız ağaçlarının hem yabani bireyleri hem de chia varyetesi çalılışma eğilimindedir. Chia varyetesinin ayırt edici en önemli özelliği; yaprakçıklarından alınabilen keskin eterik yağ kokusudur. Yabaniler ve chia varyetesi arasında reçine verimi ile tad ve aroma bakımından da ciddi farklılıklar görülür. Chia varyetesinin ülkemize Sakız Adası'ndan getirildiği tahmin edilmektedir (Baytop, 1968).

Sakız ağaçlarında yapraklar, genellikle 2-4 adet çift yaprakçıktan oluşur ve terminal yaprakçık taşımaz yani paripinnat yapıdadır. Sakız ağaçları, yaprakçık şekilleri açısından geniş bir varyasyon göstermekle birlikte yaprakçık şekilleri üzerinden yabani bireyler ile verimli genotipleri veya chia varyetesini birbirinden ayırmak mümkün değildir. *P. lentiscus*'un, incelenen yabani ve kültüre alınmış genotipleri dikkate alındığında, yüksek düzeylerde tür içi varyasyonlara sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Ege Bölgesi'nde yayılış gösteren genotiplerde morfolojik ve moleküler düzeyde tespit edilen yüksek polimorfizm, bu bölgenin *P. lentiscus* için önemli gen merkezlerinden biri olduğunu göstermiştir (Turhan Serttaş ve Özcan, 2018). Sakız ağacının kültürü yapılan 10'dan fazla klonu vardır. Ülkemizde yaygınlaşan klon; ucundan hafif girintili, ters yumurtamsı (obovat) şekli ve geniş, iri yaprakçıklarıyla ayırt edilmekte ve Sakız Adası'nda 'Maroulitis' olarak anılan klon ile benzeşmektedir. Sakız ağaçları dioik (iki evcikli) yapıdadır ve tam çiçeklenme mart sonu ile

nisan başı arasında gerçekleşir. Eriksi (drupa) yapıdaki meyveleri, aralık-ocak aylarında olgunlaşmaktadır. Türün kromozom sayısı  $2n=24$  dür (Zohary, 1952).

Sakız ağacı yetiştiriciliği, birtakım edafik faktörler, bitkinin sahip olduğu botanik özellikler ve damla sakızının iktisat tarihine konu oluş biçimiyle etnobotanik açıdan özgün bir yere sahiptir. Çeşme ve muhtelif yerlerde yapılan az miktardaki üretim haricinde damla sakızı üretimi yalnızca Sakız Adası Damla Sakızı Üreticileri Birliği bünyesinde yapılmaktadır. Bu yetiştiricilik disiplini 2014 yılında UNESCO (Birleşmiş Milletler Eğitim, Bilim ve Kültür Örgütü) tarafından İnsanlığın Somut Olmayan Kültürel Mirası Temsili Listesi'ne dahil edilmiştir. Sakız ağacı yetiştiriciliği; tarıma dayalı sanayi tezi, küçük aile işletmeciliği modeli, organik tarım sistemi ve agroturizm ile doğal bir uyum içerisindedir (Kılıç, 2019). Sakız ağacı yetiştiriciliği, temel olarak Haziran ayında ağaç altlarının (taç izdüşümü alanı) temizlenmesi, reçine damlalarının düşeceği ve hızlı kurumasına yardımcı olacak temiz bir zemin yaratmak amacıyla ağaç altlarının kireç taşı tozu (kalsiyum karbonat içerikli) ile kaplanması, temmuz-eylül arası dönemde gövde ve kalın dallarda yara yerlerinin açılması ve hasat şeklinde özetlenebilir. Reçine, primer floem tabakasında bulunan reçine kanallarını çevreleyen bir dizi salgı hücresince üretilir (İsfendiyaroğlu, 1999) ve doğal açıklıklardan, yara yerlerinden serbest bırakılır (Resim 1.1).



Resim 1.1. Sakız ağacında gövde ve doğal açıklıklardan salınan reçinenin görünümü.<sup>1</sup>

1. Fotoğraf, çalışmada kullanılan 1 numaralı genotipe aittir.

Sakız ağacının ekolojik istekleri incelendiğinde yetiştiriciliği kısıtlayan en önemli faktörün don olayı olduğu görülür. Rüzgar, reçinenin kurummasını hızlandırdığından dolayı fonksiyonel ve istenen bir durumdur. Sakız Adası'nın güneyindeki toprakların %20 ila 50 arasında kireç içerdiği bilinmektedir (Pericos, 1993). Olgun ağaçların bakımı genellikle susuz yapılmaktadır.

Sakız ağacı plantasyonları sık dikim meyve bahçesi görünümündedir (Kılıç, 2019). Dikimler genellikle 5x2, 5x2,5 m gibi mesafelerle uygulanır (Kılıç ve Uysal, 2019) ve yalnızca erkek bireyler kullanılır. Ağaçlar, yapılan budamalar sonucu genellikle şemsiye formu veya yuvarlak form alır. Çalışmaya engel olmak için budamaların her sezon düzenli olarak yapılması gerekir. Ağaçlar tam erişkinliğe 50-60 yılda ulaşırlar ve doğal koşullar altında yavaş büyürler (Pericos, 1993). Sakız ağacı yetiştiriciliğinde gençlik kısırlığı gibi bir durum söz konusu değildir fakat yatırım yapılabilirliği olumsuz etkileyen hususlardan biri, hasada dikimden 6-7 sene sonra az miktarlar ile başlanmasıdır. Verim, gövde ve kalın dalların yüzey alanıyla doğru orantılıdır. Olgun bir sakız ağacından ortalama 200-300 gram damla sakızı elde edilmektedir (Kılıç ve Uysal, 2019).

Gıda sanayisinde, birlikte kullanıldığı ürüne yüksek bir katma değer kazandıran damla sakızı çok yüksek fiyatlardan alıcı bulmaktadır. Ürünün yurtiçi piyasadaki güncel (2021) perakende satış fiyatı kilogram başına 3.400 lirayı aşarken sakız yağının litresi ise 4.000 € (avro) dolaylarındadır.

Sakız Adası Damla Sakızı Üreticileri Birliği'nin yayımladığı rapora göre damla sakızının kimyasal bileşimi; sakız uçucu yağı (%1-3), doğal polimer (poly- $\beta$ -myrcene, %25-30), triterpenik asitler (%40-55) ve diğer bileşikler (%20-25) şeklindedir (CMGA, 2005). Sakız uçucu yağı üzerine yapılan çok sayıda çalışma incelendiğinde, en önemli bileşenlerin  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -myrcen, limonen, germacren-D, terpinen-4-ol,  $\beta$ -caryophyllene olduğu görülmektedir (Boelens ve Jimenez, 1991; Magiatis vd., 1999; Fernandez vd., 2000; Castola vd., 2000; Zrira vd., 2003; Kıvçak vd., 2004; Koutsoudaki vd., 2005; Ben Douissa vd., 2005; Amhamdi vd., 2009; Akdemir, 2013; Miyamoto vd., 2014; Abdelkader vd., 2016; Keçeci, 2019).

Tıbbi aromatik bitki olarak sınıflandırılmaya müsait olan sakız ağaçlarının reçinesi (damla sakızı), Avrupa Tıp Ajansı Bitkisel Tıbbi Ürünler Komitesi tarafından geleneksel bitkisel tıbbi ürün kategorisinde değerlendirilmektedir. Çok çeşitli tıbbi araştırmalara konu olan ve potansiyel tedavi edici özellikleri halen araştırılmakta olan damla sakızı, ilaçlarda ve



besin takviyelerinde hammadde olarak değerlendirilmektedir. Damla sakızı ve uçucu yağının antiülser, anti-*Helicobacter pylori*, antimikrobiyal, antifungal, antioksidant, hipolipidemik, antienflamatuar, antikanser, antilösemik, antiseptik etkilerinin yanı sıra Crohn hastalığı ve sindirim problemlerini tedavi edici özellikleri olduğu aktarılmaktadır (Paraschos vd., 2012; Dimas vd., 2012).

Damla sakızı ayrıca parfümeri ve kozmetik alanında sabun, şampuan ve çeşitli cilt bakım ürünlerinde; tablolar, müzik aletlerinde, döşemelerde ve hatta havacılık endüstrisinde kullanılan cilaların yapımında kullanılmaktadır. Sakız ağaçları, peyzaj alanında dış mekan süs bitkisi ve bonsai olarak da kullanım alanı bulmuştur.

Üretimi günümüze kadar Sakız Adası'nın tekelinde kalan bu ürün, Orman Genel Müdürlüğü öncülüğünde ülkemize kazandırılmaya çalışılmaktadır. Bu konuda atılan en önemli adım, 2014-2019 yılları arasında hayata geçirilen Sakız Eylem Planı olmuştur ve Orman Genel Müdürlüğü'nün 2019 Faaliyet Raporu'na göre (Şubat 2020 tarihli) plan çerçevesinde 115 hektar sakız plantasyonu tesis edilmiştir (OGM, 2020). Ayrıca Mart 2020 tarihli ve 7310 sayılı Özel Ağaçlandırma Tamimi kapsamında sakız ağacına tanınan ayrıcalıklarla (deniz kıyı kenar çizgisinden itibaren kara yönünde yatay olarak 2000 metrelik mesafe sınırlamasından muaf tutulması) özel teşebbüs için yatırım yapılabilir bir seçenek oluşturulmuştur. Fakat fidan arzının düşük olması ve fidan fiyatlarındaki yükseklik, halen olası yatırımlar önündeki en büyük engel olarak gözükmektedir. Dolayısıyla homojen nitelikte ve ekonomik şekilde bahçe tesis etmek için yeterli sayıda, klon özelliklerini taşıyan fidan ihtiyacının karşılanması sakız ağacı yetiştiriciliği açısından birinci öncelik konumundadır.

Sakız ağaçlarında kullanılan geleneksel çoğaltım metodu, adi odun çeliklerinin kış veya erken ilkbahar döneminde doğrudan bahçe tesis edilecek araziye dikimi şeklindedir. Bunun dışında adi daldırma, havai daldırma ve yarı odun çelikleriyle çoğaltma yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden havai daldırma, sakız ağaçlarının çoğaltımında geçmişten bugüne dek en etkin yöntem olmuştur ve Çeşme, Urla bölgesindeki yerel fidan üreticileri tarafından hala tercih edilmektedir. Fakat geleneksel çoğaltım metotlarında karşılaşılan; yıl içerisinde dar bir periyotta uygulama imkanı, düşük köklenme veya tutma (aşıyla çoğaltım için) oranları, anaç bitkilerin çevre şartlarından etkilenmesi ve üretimi kısıtlaması, bu faaliyetlerinin hızlı ve standart yapılamayışı ve genetik muhafaza çalışmalarının gerekliliği doku kültürü uygulamalarını, in vitro koşullarda mikroçoğaltımı gündeme getirmiştir.

Bu çalışmada, tüm aşamaları ile sakız ağaçlarının mikroçoğaltımını gerçekleştirmek hedeflenmiştir. Bu hedef kendi içinde sakız ağacı eksplantlarında görülen kararmanın (fenolik oksidasyon) aşılması, sürgün gelişimi, köklenme ve dış ortama adaptasyon aşamalarını kapsamıştır. Sakız ağacı üzerinde geçmişte yapılan doku kültürü çalışmaları ve bu çalışma öncesi yapılan ön deneyler dikkate alındığında, in vitro kültürlerin sağlıklı şekilde başlatılması ve sonraki aşamalara taşınması amacıyla eksplant üzerinde ve ortamda meydana gelen kararmaların aşılması veya azaltılması zarureti ortaya çıkmaktadır. Deneylerde, genotip ve dönem faktörünün kararına problemine nasıl ve ne derece etki ettiğine yönelik bulguların elde edilmesiyle konuya dair önemli çıkarımlar yapılabileceği düşünülmüştür. Ayrıca kararına problemlerine karşı etkinliği kanıtlanmış ve daha önce sakız ağacı eksplantlarında denenmemiş yöntemlerin uygulanmasıyla problemin aşılması amaçlanmıştır. Böylelikle gelecekteki deneylerin daha efektif bir biçimde kurulabilmesine yardımcı olacak bulgulara ulaşılması ve belki de sakız ağaçlarının mikroçoğaltımında uygulanacak tam bir protokole katkı sunmak hedeflenmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sakız ağacını konu alan çeşitli doku kültürü çalışmaları mevcuttur ve türün in vitro ortamlarda çoğaltımı 2004'den beri çalışılmaktadır. Bu çalışmalarda genellikle aroma kalitesinin iyi ve reçine veriminin yüksek olduğu bilinen olgun dişi sakız ağaçlarından toplanmış tohumlar ile çeşitli sürgün eksplantları (odunlaşmış sürgün nod eksplantları ile internodyumlar, direkt doğal ortamda gelişmiş bitkilerden alınan odunlaşmış sürgün uçları, odun çeliklerinin sürdürülmesiyle elde edilen ve bunların rejenerantları olan sürgün uçları, tohumların in vitro ortamda çimlendirilmesinin ardından elde edilen juvenil sürgün uçları) birlikte kullanılmıştır. Yalnız tohum veya yalnız vejetatif kısımların kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur.

Sakız ağacının, in vitro kültür ortamlarında gösterdiği uyumsuzluk ve direncin temel sebebinin eksplantlardan salgılanan fenolik bileşikler ve kararma mekanizması olduğu söylenebilir. Bu mekanizma şu üç olgu üzerinden açıklanmaktadır: fenolik maddelerin birikimi, oksidatif enzimlerin aktivitesi ve oksidatif stres. Kararmayı tetikleyen esas etmenin eksplantlar üzerinde bistürilerle yapılan kesi işlemleri (insizyon) olduğu anlaşılmaktadır. Kesilmiş olan eksplant yüzeylerinden fenolik bileşiklerin salınımı ve oksidasyonu yaraya bir tepki olarak ortaya çıkmaktadır. Fenollerin oksidasyonu, eksplantlar üzerinde yapılan yaralamalar sonucu hücrelerin vakuollerinde ve diğer kısımlarında saklanan fenollerin hava ile teması veya enzimlerle etkileşimi şeklinde gerçekleşmektedir (Özyiğit vd., 2007). Fenolik oksidasyonun gerçekleşmesi için polifenol oksidaz (PPO) enzimi, fenolik substratlar ve enzim aktivatörü olarak da oksijen ve bakır gerekmektedir (Pekyardımcı, 1992). Bitki büyüme ve gelişme sürecinin kararmalardan ötürü fizyolojik, biyokimyasal ve hatta moleküler, hücrenel anlamda etkilenmesi söz konusudur (Chen vd., 2012).

Sterilizasyon için 30 saniye %70'lik etil alkol ve 20 dakika sodyum hipoklorit (NaOCl, %1,2 aktif klor içerikli) kullanılan Fascella vd. (2004)'nin yaptığı çalışmada eksplant diplerinde kararma tespit edilirken, WPM (Woody Plant Medium) besi ortamında kararmaların azaldığı fakat sürgün profilerasyonunun MS (Murashige & Skoog) besi ortamında daha başarılı olduğu rapor edilmiştir.

Sürgün uçlarının kullanıldığı Taşkın ve İnal (2005)'in yaptığı çalışmada, 3-4 yaşındaki genç bitki eksplantlarında en yüksek sürgün uzunluğu ile canlılık oranına 2 mg/l BAP (6-

benzilaminopürin) içeren Gamborg B5 besi ortamında erişilmiş ve hiç kararma görülmemiştir ancak bu eksplantlar alt kültüre alındığında canlılıklarını yitirmişlerdir. Daha yaşlı bitki eksplantlarında ise neredeyse %100 oranında eksplant ve ortam kararması görülmüştür. Aktif karbon (1 g/l) ilave edilen DKW (Driver & Kuniyuki Walnut) besi ortamında yakalanan %50 canlılık oranı ve sürgün oluşumu hariç, fenolik bileşiklerin etkisini engellemek için ortamlara ilave edilen veya eksplantlara uygulanan gümüş nitrat ( $AgNO_3$ , 15  $\mu M$ ), L-sistein (50, 100  $\mu M$ ) gibi maddeler beklenen etkiyi göstermemiştir.

Mascarello vd. (2007)'nin yaptıkları çalışmada eksplantlardaki kararmayı önlemek için ortama ilave ettikleri antioksidan maddelere (askorbik asit, 100 g/l ve sitrik asit, 10 g/l) rağmen bazal kısımlarda kararma meydana gelirken, WPM ortamında MS ortamından daha yüksek canlılık oranına erişilmiştir. Genç, yabani bireylerden alınan internodal eksplantların 0,5 mg/l NAA (naftalen asetik asit) içeren ortamda köklendirildiğini bildiren çalışma, olgun sakız ağaçlarının in vitro ortamda köklendirilmesine dair tek kayıttır. Köklenme yüzdesine ait kantitatif bulguların ve görsellerin paylaşılmadığı çalışmada dış ortama adapte edilen bitki sayısının çok az olduğu rapor edilmiştir.

Şenyay (2008), yapmış olduğu çalışmada 1 g/l askorbik asit ilave edilen distile ılık suda 1 saat beklettiği sürgün nod eksplantları üzerinde üç farklı sterilizasyon uygulaması arasından 24 saat boyunca 1 g/l fungusit (%50 Captan WP), 3 dk %70'lik etil alkol, 2 damla Tween-20, 10 dk %0,75'lik sodyum hipoklorit ( $NaOCl$ ) kompozisyonu ile göreceli düşük kararma oranı (%26,3) ve kontaminasyon oranlarına (%28,7) ulaşmıştır. Eksplant kararması üzerine kurulan bir başka deneyde en başarılı sonuç %1,5 sürgün oluşumu oranıyla 3 mg/l BAP ve 0,1 g/l askorbik asit içeren WPM besi ortamından %33,3 ile elde edilmiş fakat eksplantlar alt kültürlerde canlılıklarını yitirmişlerdir. Tohumların in vitro ortamda çimlendirilmesiyle elde edilen juvenil bitkiciklerde ise 0,5 mg/l BAP içeren MS ortamlarında en iyi sürgün ve nod gelişimi, 0,1 mg/l  $GA_3$  (giberellik asit) içeren MS besi ortamlarında boy uzaması, 1 mg/l IBA (indol-3-bütirik asit) içeren MS besin ortamında da %53,3 oranında köklenme bildirilmiştir.

Yine tohumların ve juvenil bitki dokularının kullanıldığı Koç (2011)'un yaptığı çalışmadan elde edilen sonuçlara göre 1 mg/l BAP ve 30 g/l sukroz içeren MS besi ortamında en yüksek proliferasyon (%71,4) ve eksplant başına en fazla gövde (1,87), nodal tomurcukların rejenerasyonu ile elde edilmiştir. En başarılı köklenme sonucu, %65 ile eksplantların 1 hafta süreyle 2 mg/l IBA içeren MS besi ortamında bekletilip bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına aktarılmasıyla elde edilmiştir.

Bahar mevsiminde ağaç üzerinden alınan henüz odunlaşmamış sürgün nod eksplantlarının kullanıldığı bir çalışmada sürgün oluşumları gözlemlense de kararmalar engellenememiş ve alt kültürlerde canlılık yitirilmiştir (Yalçın, 2011).

Dört farklı genotip üzerinde yapılan bir deneyde, farklı besi ortamlarının eksplantlar üzerinde farklı morfolojik etkilerde (yapraklarda kızılama vb.) bulunduğu ve bazı genotiplerin bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen ortamlarda dahi köklenme gösterdiği gözlemlenmiştir. Fakat bu tohum kökenli juvenil bitkiciklerde alt kültürlemeyle birlikte artış gösteren bir somaklonal varyasyon tespit edilmiştir. Kılınç (2013), ana bitki ile rejenerantları arasında IRAP (inter-retrotransposon amplified polymorphism) moleküler belirteci kullanarak yaptığı analizlerde PIC (polymorphism information content) değerini 0,331 olarak belirlemiştir.

Konuyla ilgili yapılmış kapsamlı çalışmalardan birinde Onay vd. (2014), tohum kökenli (in vitro ortamda çimlendirilmiş bitkiciklerin rejenerantları) 2 cm'lik juvenil sürgünlerden en yüksek köklenme oranına (%88) 1 mg/l IBA içeren MS besi ortamında ulaşmıştır. Doğal ortamda yetiştirilmiş olgun ağaçlardan aldıkları sürgün ucu eksplantlarında ise 40 dk %15'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) kullanımının uygun olduğunu belirlemiş fakat yine de %45 canlılık oranı ve %55 eksplant kararması ile karşılaşmışlardır. Ayrıca kültüre alınan sürgün uçlarının dip kısımlarında meydana gelen kararmaların engellenmesi için besi ortamlarına ilave edilen antioksidanların (askorbik asit, sitrik asit, polivinilpirolidon) etkisiz olduğu rapor edilmiştir. Doğal ortamda yetişen bitkilerden alınan odunlaşmış sürgün uçları çok yavaş gelişme göstermiş veya kahverengileşerek hiç gelişme göstermemiştir. Bunun üzerine, odun çeliklerinin eksplant kaynağı olarak kullanılması ve yeni sürgünler oluşturmaya zorlanmasıyla elde edilen taze sürgün uçları denenmiş ve daha iyi sonuç alınmıştır. Çeliklerden zorlama yöntemleriyle elde edilen taze sürgün uçlarında 10 dk %10'luk NaOCl uygulamasıyla eksplantların %90'ı canlı kalırken kararma (kahverengileşme) görülmemiştir (Onay vd., 2014; Çalar vd., 2016). Tek boğum içeren, minimum 1 cm uzunluğundaki taze sürgün ucu eksplantlarında en fazla sürgün sayısı ve uzunluğuna Gamborg B5 vitaminleri, 0,5 mg/l GA<sub>3</sub> ve 1 mg/l BAP içeren MS besi ortamında erişilmiştir. Fakat bu deneylerin devamında olgun ağaçlara ait eksplantlar köklendirilememiştir (Onay vd., 2014).

Karşılaşılan köklenme problemleri karşısında, çeşitli eksplant tiplerinin dar meristemli yarma aşısı yöntemiyle antep fıstığı (*Pistacia vera*), menengiç (*Pistacia terebinthus*), atlantik sakızı (*Pistacia atlantica*) ve butum (*Pistacia khinjuk*) anaçlarına mikroaşılanması

çalışılmıştır. Çeliklerden zorlanmış sürgünlerin in vitro rejeneratlarında yakalanan, antep fıstığı anaçları üzerine %100'lük aşu tutma ve dış ortama adaptasyon başarısı, sakız ağacının kitlesel çoğaltılmasında rutin olarak kullanılabilir bir yöntem olarak önerilmiştir (Onay vd., 2016).

Endokarbı çitlatılmış tohumların sterilizasyonu için 20 dk %20'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) uygulamasının yüksek çimlenme oranı (%86) ve sıfır kontaminasyon ile yapılabildiği rapor edilmiştir (Kılınç vd., 2014). Sakız ağacı tohumlarının in vitro çimlendirilmesi ve juvenil sürgün profilerasyonu ile ilgili çalışmalarda elde edilen bulgular birbiriyle büyük ölçüde örtüşmektedir. Yıldırım vd. (2019) tarafından optimize edilen koşullar, 30 g/l sukroz, 0,5 mg/l GA<sub>3</sub> veya 100 mg/l valin veya 100 mg/l alanin destekli 1 mg/l BAP içeren MS ortamı olarak tanımlanmıştır.

Mikroçoğaltımın yanı sıra orta ve uzun süreli genetik muhafaza ile sakız ağacının sahip olduğu zengin fitokimyasalların (sekonder metabolitlerin) in vitro üretimi amacıyla yapılmış çalışmalar mevcuttur. Koç (2011) tarafından yapılan çalışmada %3 sodyum aljinat (Na-Alg) ile enkapsüle edilerek sentetik tohumlara dönüştürülen gövde uçlarının, 4 °C sıcaklıkta ve karanlık ortam koşullarında 6 aya kadar saklanabileceği bildirilmiştir.

İn vitro ortamda çimlendirilen juvenil bitki yaprak ve köklerinin kullanıldığı bir çalışmada en yüksek kallus oluşumu ve kalitesi (yumuşak ve dağılgan tekstürde), 1 mg/l kinetin ve 1 mg/l 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) içerikli MS besi ortamından elde edilmiştir (Demir, 2018). Hücre süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu üzerine yapılan araştırmada en başarılı sonuçlar; 25 °C sıcaklık, 95 rpm çalkalama hızı, pH 5 ile 30 g/l sukroz, 1 mg/l kinetin ve 1 mg/l 2,4-D içerikli MS besi ortamı koşullarından elde edilmiştir (Hoşer, 2018).

Doğal ortamda yetiştirilen sakız ağacından elde edilen uçucu yağda, in vitro ortamda yetiştirilen juvenil bitkiciklerden elde edilene göre daha fazla sayıda uçucu bileşen bulunmuştur. Kontrollü şartlar altında, besi ortamlarında yetiştirilen bitkiler, uçucu yağların sentezlenmesine neden olan faktörlerin çoğundan izole olduklarından dolayı daha az sayıda uçucu bileşen sentezlemişlerdir (Akdemir, 2013). Sığınç Çetin (2018), juvenil sürgün ucu kültürleri üzerine bazı abiyotik stres faktörleri (sıcaklık, ışık, tuz ve ultraviyole-B ışını) uygulayarak antikanser özellik gösteren triterpenoid yapıdaki bazı sekonder metabolitlerin miktarını arttırmayı denemiş ve 100 mg/l'lik tuz elisitasyonu, 4 °C düşük sıcaklık ve 5 gün boyunca 15 dk ultraviyole-B ışın uygulamalarının yaprak eksplantlarına ait kontrol

gruplarında bulunmayan mastikadienolik asitin sentezine yol açtığını tespit etmiştir. Benzer bir çalışmada bakır nitrat ( $\text{CuNO}_3$ ), kobalt klorür ( $\text{CoCl}_2$ ), kurşun nitrat ( $\text{PbNO}_3$ ) ve gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) ağır metal uygulamalarının bazı triterpenoidlerin sentezlenmesini sağladığı veya artışa neden olduğu bildirilmiştir (Akkuş, 2018).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Araştırma, 2020-2021 yıllarında, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Çalışmada başlangıç bitki materyali olarak 20-25 cm'lik 1-2 yıllık odun çelikleri kullanılmıştır. Çeliklerden elde edilen taze sürgün uçları ise doku kültüründe eksplant olarak kullanılmıştır. Çelikler, İzmir'in Çeşme İlçesine bağlı Çiftlik Mahallesi'nde bulunan Çiftlikköy Örnek Sakızlığı'ndaki yaklaşık 20 yaşındaki erkek bireylerden temin edilmiştir. Bahçenin koordinat bilgileri 38°17'50.7"K 26°17'01.5"D şeklindedir. Genotipler, yapılan morfolojik gözlemlerin (dallanma, yaprakçık şekli, sürgün uçlarının yapısı gibi) yanı sıra doğal açıklıklar ve çizim yerlerinden salgılanan reçinenin tad ve miktarı da dikkate alınarak, birbirinden farklılık arz edecek şekilde seçilmişlerdir. Bu genotipler çalışmada G1, G2, G3 ve G4 (yabani) olarak anılmış ve sıralama, tahmini agronomik performansa göre yapılmıştır. Yabani genotip, bahsedilen sakızlığa 50 metre uzaklıkta yer almaktadır. Kullanılan genotiplere ait yaprak örnekleri Resim 3.1'de verilmiştir.



Resim 3.1. Çalışmada kullanılan genotiplere ait yaprak görünümleri.<sup>1</sup>  
1. G1 (sol üst), G2 (sağ üst), G3 (sol alt) ve G4 (sağ alt, yabani).



## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Eksplant Kaynağının Hazırlanması

Çelikler, biri yabancı olmak üzere toplam 4 genotipten, Kasım ve Aralık 2020 ile Ocak 2021 aylarının 19 ila 21. günleri arasında, her ay 10 adet olacak şekilde ağaçların dört bir yönünden toplanmıştır. Dolayısıyla araştırmaya her ay 40 çelikle başlanmış ve toplamda 120 adet çelik kullanılmıştır. Bahçeden alınan çelikler, içerisinde buz torbası ve nemli perlit bulunan dondurulmuş gıda poşetleriyle laboratuvara taşınmış ve en geç 24 saat içinde işleme alınmıştır. Önce çeşme suyu altında ardından distile su ile yıkanan çeliklerin dip kısımları başta olmak üzere yara yerleri, %70'lik etil alkol ile muamele edilmiş pamukla silindikten sonra beşerli gruplar halinde Çalar vd. (2016)'nin elde ettiği bulgular ışığında 250 ml steril distile su içeren kavanozlara alınmış ve yeni sürgünler oluşturmaya zorlanmıştır. Kavanozlardaki su, haftada bir yenilenmiş ve her yenileme öncesi çeliklerin dip kısımlarındaki 0,5 cm'lik kısım budama makasıyla kesilerek uzaklaştırılmıştır. Bu süre zarfında çelikler, 25 °C sıcaklık ve 16 saat aydınlık fotoperiyot koşulları altında iklim odasında muhafaza edilmiştir.

Aynı türe ait farklı genotip eksplantlarında fenolik bileşiklerin konsantrasyonu ve kompozisyonu değişmektedir (Das ve Srivastav, 2015). Örneğin; Cardinal ve Uslu asma çeşitlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada eksplantlardaki kararma, genotipe ve eksplant alınan döneme bağlı bulunmuştur (Baydar, 2006).

### 3.2.2. Besi Ortamlarının Hazırlanması

Araştırmada temel besi ortamı olarak MS besi ortamı (Duchefa Biochemie, Katalog No: M0222) kullanılmıştır. Çalışmadaki toplam 4 farklı besi ortamı içeriği bu besi ortamının türevi şeklindedir (Çizelge 3.1). İlk aşama olan ve kararmayı inhibe etmeye yönelik kurulan başlangıç deneylerinde 2 farklı besi ortamı kullanılmıştır. Bunlar sırasıyla 30 g/l sukroz içeren MS ve 10 g/l sukroz, 1 g/l aktif karbon içerikli yarım kuvvette MS ortamları olup 1 ve 2 numara olmak üzere çizelgede de belirtilmiştir. Sürgün gelişimini teşvik etmek amacıyla kurulan ikinci aşama alt kültürlerde ve sonrasındaki köklenme ortamlarında ise tek tip besi ortamı kullanılmıştır. Bunun için sırasıyla 30 g sukroz, 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l GA<sub>3</sub> içeren MS ve 30 g sukroz ile 2 mg/l IBA içeren MS ortamları tercih edilmiştir. Bu tercihler, konuyla ilgili geçmiş çalışmaların bulgularınca şekillenmiştir. Tüm ortamlarda pH (5,8) ve agar (6 g/l) değerleri sabit tutulmuştur. Besi ortamlarının sterilizasyonu 15 dakika boyunca 121 °C

sıcaklık koşullarında otoklavda sağlanmıştır. Hazırlanan GA<sub>3</sub> çözeltileri ise 0,2 mikronluk filtre ile steril hale getirilmiş ve besi ortamlarının magenta kaplarına dökülmesi öncesi ortamlara ilave edilmiştir. Her magenta kabına yaklaşık 30 ml besi ortamı doldurulmuştur. Kullanılan bitki gelişim düzenleyicileri 2-3 ml etanolde çözdürüldükten sonra distile su ile istenilen hacimlere tamamlanmıştır. Pens ve bistüri gibi aletlerin sterilizasyonu, biyogüvenlik kabini içerisinde cam boncuklu sterilizatör aracılığıyla yapılmış ve dikim işlemleri öncesi yeterince soğumaları beklenmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan MS besi ortamının içeriği ve kullanılan türevleri.

Kimyasal Madde	mg/l	Ortam No	İçerik
KNO <sub>3</sub>	1900	1 (Kontrol)	MS + 30 g/l sukroz
CaCl <sub>2</sub>	332,02	2	½ MS + 10 g/l sukroz + 1 g/l A.K. <sup>1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	3	MS + 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l GA <sub>3</sub>
MgSO <sub>4</sub>	180,54	4	MS + 2 mg/l IBA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170		
FeNaEDTA	36,7		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2		
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9		
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6		
KI	0,83		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25		
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025		
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025		
Glisin	2,0		
myo-İnositol	100		
Nikotinik asit	0,5		
Piridoksin-HCl	0,5		
Tiyamin HCl	0,1		

1. Aktif karbon

### 3.2.3. Başlangıç Dikim Uygulamaları ve Sterilizasyon

Çeliklerin saf suda sürdürülmesiyle elde edilen taze sürgün uçları, doku kültürü deneylerinde eksplant olarak kullanılmıştır. Bu yeni sürgünler çalışmada eksplant kaynağı olarak kullanıldığından, çeliklerden elde edilen sürgün sayısı miktarınca başlangıç uygulamaları yapılabilmiş ve uygulamalar arasında belirli bir öncelik sırası takip edilmiştir.

Çeliklerden ayrılan sürgün uçları hemen suya alınmış ve çeşme suyu altında yıkanmıştır. Eksplantların yüzey sterilizasyonu 10 dakika boyunca, distile su ile seyreltilmiş %15'lik ticari çamaşır suyu solüsyonuyla sağlanmış ve 3 kez beşer dakika olmak üzere steril

saf su ile durulanmıştır. Çalkalama işlemleri elle yapılmış ve durulama sonrası filtre kağıtları üzerinde eksplantların bir miktar kurumaları beklenmiştir. Sterilizasyon ve uygulamalar sonrası değerlendirmeler dikimden sonraki 14. günde yapılmıştır. Eksplantlar magenta kaplarına üçer adet, 15-25 mm arası uzunluklarda dikilmiştir. Dikim esnasında eksplantlar üzerinde mümkün olduğunca az yara yeri oluşturmaya özen gösterilmiştir. Dikimi tamamlanan magenta kapları, 25 °C sıcaklık ve 16 saat aydınlık fotoperiyot koşullarında muhafaza edilmiştir.

İlk aşamada, kültüre alınan eksplantların kararmasını engellemek veya azaltmak amacıyla besi ortamlarında bitki gelişim düzenleyicisi kullanılmamıştır ve kontrol grubu hariç 5 farklı uygulama planlanmıştır. Bunlar; *i*) eksplantların düşük miktarda (10 g/l) sukroz ve aktif karbon içeren (1 g/l) yarım kuvvette MS (1/2 MS) ortamlarına dikilmesi (A), *ii*) kesim yapılan eksplant diplerinin parafınle kaplanması (P), *iii*) dikimi tamamlanan magentaların iklim odasına alınmadan önce 24 saat boyunca 4 °C soğuk ve karanlık koşullarda buzdolabında bekletilmesi (S), *iv*) eksplantların yüzey sterilizasyonunda sodyum hipoklorit (NaOCl) yerine 1 g/l fungusit (%50 Captan WP) kullanılması (30 dk) (F), *v*) eksplantların 50 mg/l'lik giberellik asit solüsyonunda çalkalanması (60 dk) (G) uygulamalarıdır. Bu uygulamalar, çizelgelerde, parantez içlerinde verilen kısaltmalarla [sırasıyla K (kontrol), A, P, S, F ve G] belirtilmiştir. Kontrol grubu olarak yalın MS besi ortamı (30 g/l sukroz ve 6 gram agar içeren) kullanılmıştır. Her uygulama 5 tekerrürlü şekilde 15 eksplant ile yürütülmüştür.

Otoklavda steril hale getirilen sentetik, renksiz parafın, kullanım öncesi biyogüvenlik kabini içerisinde ısıtıcı manyetik karıştırıcıda eritilmiş ve ılık şekilde uygulanmıştır. Eksplantlardaki karar ve kahverengileşme şiddeti, dört kademeli (0: karar ve madde salınımı yok, 1: kesilen kısımlardaki yüzeysel kararmalar dahil düşük şiddette karar, 2: orta şiddette karar, 3: yoğun, tamamen karar) olarak dikimden itibaren 14. günde değerlendirilmiştir. Gözlemler, daha sonra Yang vd. (2010) tarafından belirtilen formül üzerinden karşılaştırılmıştır:  $\Sigma$  (karar şiddeti  $\times$  ilgili karar şiddetindeki eksplant sayısı) / (toplam eksplant sayısı).

Besi ortamlarında kullanılan aktif karbonun, daha düşük mineral tuz veya şeker konsantrasyonlarının çeşitli türlerde karşılaşılan kararmayı azalttığı veya etkileyebileceğine dair örnek çalışmalar mevcuttur (Patel vd., 2018; Boudabous vd., 2010; Mereti vd., 2002; Rana vd., 2016; Altunok ve Er, 2013). Aktif karbonun polifenoller ve toksik ürünleri adsorbe etme özelliğinin yanı sıra karanlık bir ortam yaratarak oksidatif enzimlerin aktivitesini de

inhibe ettiği düşünülmektedir (Patel vd., 2018). Kararma oksidatif bir reaksiyon olduğu için kesilmiş yüzeylerin oksijenle temasını kesmek ve fenolik madde birikimine karşı fiziksel bir bariyer oluşturmak amacıyla parafin vb. maddeler kullanılabilir. *Dioscorea alata* (Yam) üzerinde yapılan bir çalışmada bu yöntemle kontrol grubunda çoğu ölümle sonuçlanan %84'lük kararma oranı, %18'e düşürülmüş ve eksplantlarda %90 oranında canlılığa ulaşılmıştır (Bhat ve Chandel, 1991). Dobranszki ve Teixeira da Silva (2010), oksidatif enzimlerin çevre şartlarından etkilendiğini, ışık varlığı ile yüksek sıcaklık koşullarında artan oksidatif enzim aktivitesinin daha yoğun kararma meydana getireceğini belirtmiştir. Kültür ortamlarının ilk birkaç gün süresince karanlık veya düşük sıcaklık koşullarında muhafaza edilerek PPO gibi oksidatif enzimlerin aktivitesininin azaltılmasına yönelik çözümler kullanılmaktadır. Mustafa vd. (2013)'nin aktardığına göre gıda endüstrisinde de kararma problemlerine karşı en sık başvurulan yaklaşım düşük sıcaklık uygulamalarıdır (Ohlsson, 1994). Eksplantların yüzey sterilizasyonunda kullanılan etanol, Tween-20, sodyum hipoklorit (NaOCl), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), civa klorür (HgCl<sub>2</sub>) gibi sterilant maddelerin konsantrasyonu ve uygulama süreleri arttıkça kararmanın şiddetlendiği çeşitli yayınlarda bildirilmiştir (Nayanakantha vd., 2010; Alp vd., 2010; Moradpour vd., 2016; Ersalı vd., 2017; Salam vd., 2019). Çölgeçen vd. (2011) ile Mbah ve Wakilne (2012)'ye atfen Nartop (2018), bu sterilantların genelde toksik etki göstererek, in vitro koşullardaki büyüme ve gelişmeyi engellediğini veya kararmalara sebep olduğunu belirtmiştir. Giberellik asit ile fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enzim etkileşiminin araştırıldığı bir çalışmada, *Phalaenopsis* eksplantlarının 25 mg/l GA<sub>3</sub> solüsyonunda 20 dakika çalkalanmasının kararmayı belirgin şekilde azalttığı bildirilmiş ve giberellik asidin oksidatif enzimlerin aktivitesini inhibe edici özellikte olabileceği ileri sürülmüştür (Zhou vd. 2009).

#### **3.2.4. Sürgün Proliferasyonu**

Herhangi bir bitki gelişim düzenleyicisi içermeyen başlangıç ortamlarının ardından enfekte olmamış, düşük şiddette veya hiç kararma gözlemlenmeyen, yeteri kadar yeşil dokuya sahip, kloroz ve sürgün ucu nekrozundan yoğun şekilde etkilenmemiş eksplantlar alt kültüre alınmıştır. İlk alt kültürlerde (II. aşama) tüm genotip ve eksplantlar için sürgün gelişimi, boy uzaması ve/veya sürgün oluşumunu teşvik etmek amacıyla, kullanılan standart besi ortamına ilaveten 1 mg/l BAP ve 0,5 mg/l GA<sub>3</sub> içeren MS besi ortamı kullanılmıştır. Alt kültüre alma işlemleri esnasında eksplantların kararın dip kısımları (1-2 mm) uzaklaştırılmış fakat gereksiz kesim yapılmamasına dikkat edilmiştir.

### **3.2.5. Köklendirme ve Adaptasyon**

Bu aşamada (III.) eksplantların köklenmesini sağlamak amacıyla, kullanılan standart besi ortamına ilaveten 2 mg/l IBA içeren MS besi ortamı kullanılmıştır. Köklendirme ortamları 3 haftalık arayla bir kez yenilenmiş ve toplamda 6 haftalık olarak değerlendirilmiştir. Alt kültüre alma işlemi esnasında eksplantlar hassasiyetle taşınmış ve diplerinde herhangi bir kesim yapılmamıştır. Yalnızca gövde ucunda oluşan istenmeyen kallus oluşumları temizlenmiştir.

### **3.3 Araştırmada İncelenen Konular**

Çalışmada; çelik alınan dönem ve genotipin taze sürgün ucu elde etmeye etkisi (elde edilen eksplant sayısı / süren çelik sayısı), kararmaya yönelik uygulamalar ile çelik alınan dönem ve genotipin kararmaya etkisi, kararmaya yönelik uygulamalar ile çelik alınan dönem ve genotipin sürgün gelişimi ile adventif tomurcuk (sürgün) oluşumu üzerine etkisi (% sürgün gelişimi gösteren eksplant oranı, % tomurcuk oluşturan eksplant oranı, eksplant başına düşen tomurcuk sayısı), çelik alınan dönem ve genotipin köklenme ve kallus oluşumu üzerine etkisi (% köklenme oranı, % kallus oluşturma oranı, eksplant başına düşen kök sayısı) incelenmiştir.

### **3.4. Verilerin Analizi**

Başlangıç kültürlerinde denemeler, her bir uygulama için 5 magenta ve her magentada 3 eksplant olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Araştırmadan elde edilen verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS 26 paket programından yararlanılmıştır. Grafiklerin oluşturulmasında Microsoft Excell paket programı kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Çelik Alınan Dönem ve Genotipin Taze Sürgün Ucu Elde Etmeye Etkisi

Çeliklerin, distile suya alınmasından itibaren ortalama 14 gün içinde yeni sürgünler oluşturdukları tespit edilmiştir (Resim 4.1). Bu süre içinde farklı genotiplere ait çeliklerin, saldıkları koku ve maddeler aracılığıyla suyu ve ortamı kirletme dereceleri farklılık göstermiştir. Çelik alınan 3 dönem için de geçerli olmak üzere; en çok sayıda ve en kısa sürede sürgün oluşturan genotip 4 numaralı yabancı birey olurken, en az sayıda ve en uzun sürede yeni sürgünler oluşturan genotip 3 numaralı olmuştur. Bu durum çeliklerin canlı kalma süreleriyle de paralellik göstermiş ve 4 numaralı genotipe ait çelikler, yeni sürgünler oluşturduktan kısa süre sonra (2-4 gün) canlılıklarını kaybederken 3 numaralı genotipe ait yeni sürgünler ise daha uzun süre (7-12 gün) canlı kalmışlardır. Kasım ayında 1 numaralı genotipten alınan 10 adet çeliğin yalnızca 4'ü yeni sürgünler oluştururken, diğer tüm genotip-dönem kombinasyonlarında en az 7 adet çeliğin sürdüğü görülmüştür. Süren çeliklerden elde edilen ortalama sürgün (anormal gelişim gösterenler hariç, dikim yapılabilir boy ve sağlıkta) sayısı Çizelge 4.1'de ve karşılaştırmalı olarak Şekil 4.1'de verilmiştir. Buna göre 20-25 cm'lik çelikler, çelik başına ortalama en az 2,38 ve en çok 9,2 adet sürgün meydana getirmiştir. Örnek alınan dönemler açısından bakıldığında 1, 2 ve 3 numaralı genotiplere ait çeliklerin meydana getirdiği ortalama sürgün sayısı giderek artış gösterirken 4 numaralı genotipte tam tersi bir durum görülmüştür. Tüm genotiplerin ortalaması alındığında ise çelik başına düşen ortalama sürgün değeri 6,57 ile Ocak ayında en yüksek seviyede bulunmuştur.

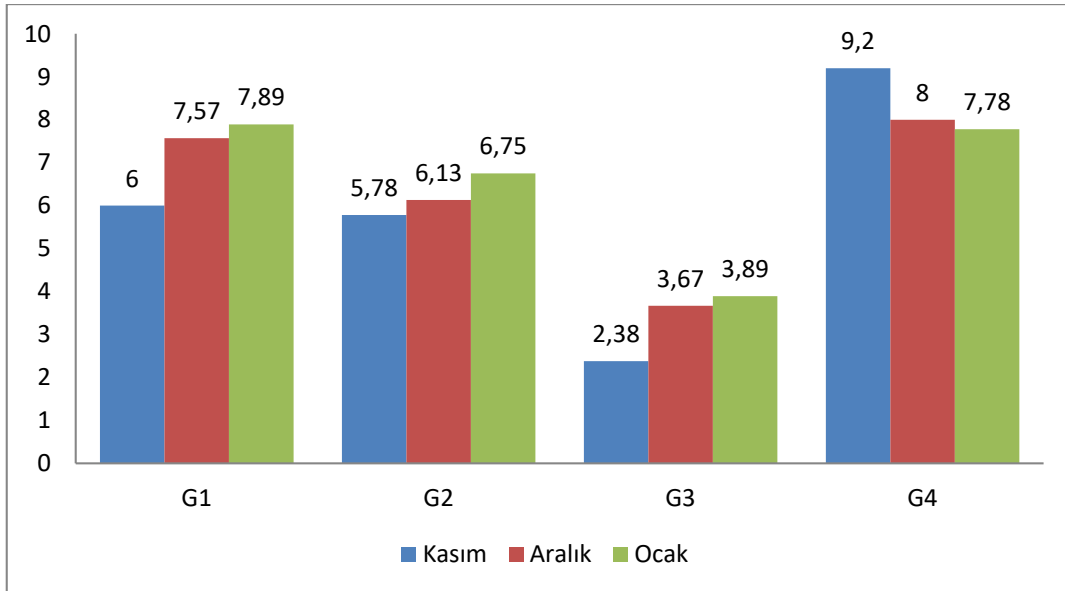
Çizelge 4.1. Çeliklerin farklı dönem ve genotiplerde sürgün oluşturma performansları.

	Kasım 2020 (Adet)	Aralık 2020 (Adet)	Ocak 2021 (Adet)	Dönem Ort.
G1	4, (24) : 6,00	7, (53) : 7,57	9, (71) : 7,89	7,40
G2	9, (52) : 5,78	8, (49) : 6,13	8, (54) : 6,75	6,20
G3	8, (19) : 2,38	9, (33) : 3,67	9, (35) : 3,89	3,35
G4	10, (92) : 9,20	9, (72) : 8,00	9, (70) : 7,78	8,36
Genotip Ort.	6,03	5,59	6,57	

Değerler; süren çelik sayısı, (elde edilen eksplant sayısı) (solda) : süren çelik başına elde edilen ortalama eksplant sayısını (sağda) ifade etmektedir.



Resim 4.1. Sakız ağacı çeliği üzerinde gelişen sürgünler.



Şekil 4.1. Süren çelik başına elde edilen eksplant (sürgün ucu) sayısındaki değişimler (adet).

#### 4.2. Eksplantlardaki Enfeksiyon ve Kontaminasyon Durumu

Eksplantlara uygulanan sterilizasyon işlemlerinin ardından en az %1,67 en çok %40,00 oranında enfeksiyonla karşılaşmıştır. Genotip ve örnek alım dönemlerine ait bulgular, parantez içerisinde işlemin kaç adet eksplanta uygulandığı bilgisiyle birlikte Çizelge 4.2’de verilmiştir. Aralık ayındaki ortalama enfekte eksplant oranı %6,11 olurken Kasım ve Ocak aylarında sırasıyla %21,33 ve %21,54 olduğu görülmüştür. En düşük ortalama enfeksiyon değeri %6,67 ile 3 numaralı genotipte tespit edilirken, %27,41 oranıyla 2 numaralı genotip en yüksek ortalama enfeksiyon değerine sahip genotip olarak ortaya çıkmıştır. Başlangıç

uygulamalarından biri olan captan etken maddeli fungusit ile gerçekleştirilen sterilizasyonda ise (çizelgede belirtilmemiştir) %73,32 oranında enfeksiyon görülmüştür. Çalışmanın devam eden alt kültürlerinde herhangi bir kontaminasyonla karşılaşılmasıdır.

Çizelge 4.2. İn vitro ortamlarda karşılaşılan enfeksiyon oranları (%).

	Kasım 2020	Aralık 2020	Ocak 2021	Genotip Ort.
G1	%40,00 (15)	%6,67 (45)	%21,67 (60)	%18,33
G2	%31,10 (45)	%11,10 (45)	%40,00 (45)	%27,41
G3	%13,32 (15)	%6,67 (30)	%3,32 (30)	%6,67
G4	%13,32 (75)	%1,67 (60)	%16,67 (60)	%10,77
Dönem Ort.	%21,33	%6,11	%21,54	

Parantez içindeki sayılar, verilen oranların kaç adet eksplantın ortalaması olduğunu belirtmektedir.

### 4.3. Kararmaya Yönelik Uygulamalar ile Çelik Alınan Dönem ve Genotipin Kararmaya Etkisi

Dikim yapılan 540 eksplanttan 362'si (%67,04) düşük, orta veya yüksek şiddette kararma göstermiştir (Resim 4.2). Kararmalar çoğunlukla düşük şiddette ve eksplantların kesilen dip kısımlarında meydana gelmiştir. Yöntemler kısmında ifade edilen formül [ $\Sigma$  (kararma şiddeti  $\times$  ilgili kararma şiddetindeki eksplant sayısı) / (toplam eksplant sayısı)] aracılığıyla genotip, örnek alınan dönem ve uygulamalara ait ortalama değerler incelendiğinde en az 0,07 en çok 1,73 şiddetinde kararma meydana geldiği görülmüştür. Dönem, genotip ve uygulamalara ait kararma şiddetleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.



Resim 4.2. Orta şiddette kararma gösteren eksplantlar.



Çizelge 4.3. Eksplantlarda gözlemlenen kararma şiddetleri.

		K <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	S <sup>4</sup>	F <sup>5</sup>	G <sup>6</sup>
Kasım	G1	1,22					
	G2	1,13	1,00	0,18			
	G3	1,31					
	G4	1,07	1,00	0,15	1,23	1,00	1,73
Aralık	G1	1,14	1,07	0,21			
	G2	1,28	1,67	0,29			
	G3	1,07	1,08				
	G4	1,00	1,47	0,07	1,07		
Ocak	G1	1,00	1,00	0,18	1,00		
	G2	1,22	1,13	0,30			
	G3	1,07	1,00				
	G4	1,00	1,00	0,08	1,00		

0,00-3,00 arası değerler gösterilmektedir.

1. MS (30 g/l sukroz)
2. Yarım kuvvette (1/2) MS (10 g/l sukroz, 1 g/l aktif karbon)
3. MS (30 g/l sukroz) + eksplant diplerinin parafinle kaplanması
4. 24 saat soğuk-karanlık muhafaza + MS (30 g/l sukroz)
5. Fungusit (%50 captan WP, 30 dk) sterilizasyonu + MS (30 g/l sukroz)
6. Gibereellik asit solüsyonunda çalkalama (50 mg/l, 60 dk) + MS (30 g/l sukroz)

İn vitro ortamlarda meydana gelen kararmaların, kontrol grupları üzerinden değerlendirildiğinde ocak dönemine doğru genellikle azalan veya sabit bir seyirde olduğu görülmüştür. Eksplantların kesilen dip kısımlarının kaplanması yoluyla fenolik madde sızıntısını ve dolayısıyla kararmayı engellemeye yönelik kullanılan parafin uygulamasının, kararmayı belirgin şekilde azalttığı hatta neredeyse tamamen engellediği görülmüştür (Resim 4.3). Ancak alt kültüre alındıktan sonra parafinin uzaklaştırılmasıyla düşük şiddette de olsa karardıkları gözlemlenmiştir. Kararmayı engellemeye yönelik diğer uygulamalardan aktif karbonlu besi ortamı kullanımı ve dikim sonrası 24 saatlik soğuk-karanlık muhafaza ise beklenen etkiyi göstermemiştir.

Başlangıç kültürlerinde, dip (bazal) kısımlardan yayılan kararma ve fenolik madde sızıntılarından ziyade sürgün uçlarında meydana gelen şiddetli fizyolojik bozukluklar büyük problem yaratmış ve alt kültüre alınan bitki sayısını kısıtlamıştır. Yaprakçıklar ve sürgün uçlarında önce renk değişimleri (sarıdan başlayıp turuncu ve kahverengiye dek) ardından da dökülmeler görülmüştür (Resim 4.4).



Resim 4.3. Parafin uygulanmış (solda) ve uygulanmamış (sağda) eksplantların ortamı kirletme dereceleri.



Resim 4.4. Yaprak ve sürgün uçlarında görülen fizyolojik bozukluklar.

Yapılan iki yönlü ANOVA test sonuçlarına göre çelik alınan dönem ve genotipin kararma üzerine etkisi, istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır. Varyans analizi test sonuçları Çizelge 4.4'de sunulmuştur. Başlangıç kültürlerinde kararmanın değerlendirildiği istatistiksel analizlerde, kontrol grupları üzerinden her bir magenta kabının kararma şiddeti ortalaması kullanılmıştır.

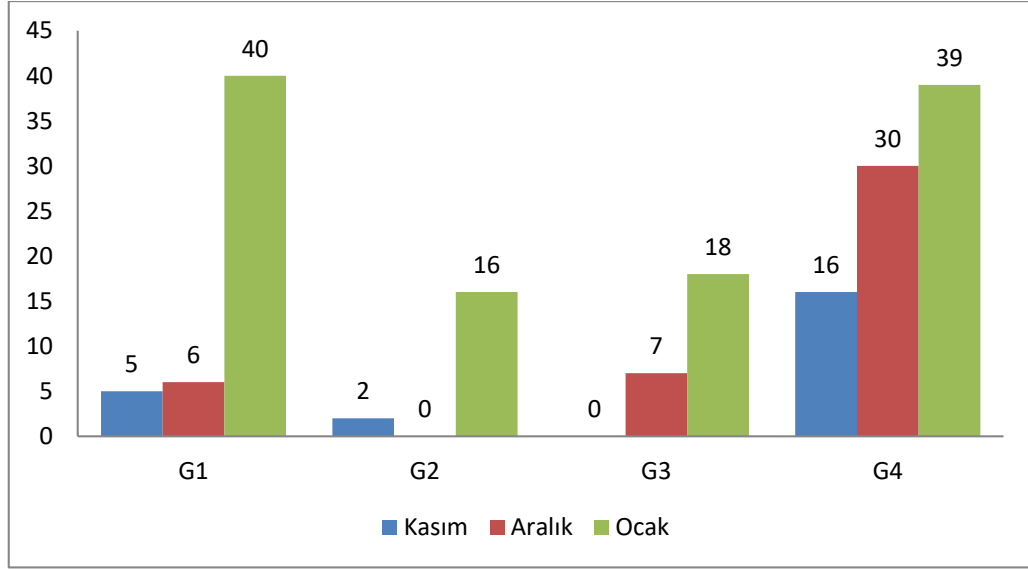
Çizelge 4.4. Dönem ve genotipin kararmaya etkisine dair varyans analizi test sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Tip III Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri	Önemlilik
Düzeltilmiş Model	0,058 <sup>a</sup>	11	0,005	0,810	0,630
Kesme Noktası	7,731	1	7,731	1195,030	< 0,001
Dönem	0,023	2	0,012	1,805	0,176
Genotip	0,010	3	0,003	0,521	0,670
Dönem * Genotip	0,024	6	0,004	0,627	0,708
Hata	0,304	47	0,006		
Toplam	8,146	59			
Düzeltilmiş Toplam	0,362	58			

a. R Kare = 0,159 (Düzeltilmiş R Kare = -0,037)

#### 4.4. Alt Kültür İşlemleri

Kasım ayında 165 eksplant, aralık ayında 180 eksplant ve ocak ayında 195 eksplant olmak üzere toplamda 540 adet eksplant (odunlaşmamış, yeşil sürgün uçları) in vitro ortamlarda kültüre alınmıştır. Bunlardan kasım'da 23 adet, aralık'ta 43 adet ve ocak'ta 113 adet olmak üzere toplam 179 eksplant alt kültüre alınmıştır. Dolayısıyla, dönemler itibarıyla eksplantların canlılık ve alt kültüre alınma oranı gittikçe artmıştır. Ardından 8 adet aralık, 88 adet ocak döneminde olmak üzere toplamda 96 adet eksplant köklendirme ortamına alınmıştır. Başlangıç uygulamaları incelendiğinde ise en yüksek alt kültüre aktarma oranının %48,33 ile soğuk-karanlık muhafaza uygulamasında olduğu görülmüştür. Bunu sırasıyla A (%42,00), P (%33,33) ve K (%26,11) grupları takip etmiştir. Tüm dönemler incelendiğinde, alt kültüre (II. aşamaya) alınan eksplantların 85 adeti yani yaklaşık yarısı (%47,49) 4 numaralı genotipe ait olduğu tespit edilmiştir. Farklı dönem ve genotiplerde alt kültüre (II. aşama) alınan eksplant sayısındaki değişim Şekil 4.2'de verilmiştir. Alt kültür işlemlerine ait detaylı sayısal veriler Çizelge 4.5'de sunulmuştur.



Şekil 4.2. Farklı dönem ve genotiplerde ikinci aşama alt kültürlerine alınan eksplant sayısındaki değişimler (adet).

Çizelge 4.5. Alt kültüre alınan eksplant sayıları.

		K <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	S <sup>4</sup>	F <sup>5</sup>	G <sup>6</sup>
Kasım	G1	5					
	G2	2	0	0			
	G3	0					
	G4	2	9	5	0	0	0
Aralık	G1	0	3 : 3	3			
	G2	0	0	0			
	G3	4 : 4	3				
	G4	7	8	6 : 1	9		
Ocak	G1	10 : 10	12 : 12	7 : 7	11 : 8		
	G2	3 : 2	7 : 2	6 : 6			
	G3	6 : 4	12 : 11				
	G4	8 : 5	9 : 3	13 : 10	9 : 8		

Değerler, sürgün gelişimi ortamlarına (II. aşama) ve ardından (:) köklenme ortamlarına (III. aşama) alınan eksplant sayısını göstermektedir.

1. MS (30 g/l sukroz)
2. Yarım kuvvette (1/2) MS (10 g/l sukroz, 1 g/l aktif karbon)
3. MS (30 g/l sukroz) + eksplant diplerinin parafinle kaplanması
4. 24 saat soğuk-karanlık muhafaza + MS (30 g/l sukroz)
5. Fungusit (%50 captan WP, 30 dk) sterilizasyonu + MS (30 g/l sukroz)
6. Gibereellik asit solüsyonunda çalkalama (50 mg/l, 60 dk) + MS (30 g/l sukroz)

#### 4.5. Başlangıç Uygulamaları ile Çelik Alınan Dönem ve Genotipin Sürgün Gelişimi, Sürgün Oluşumu Üzerine Etkisi

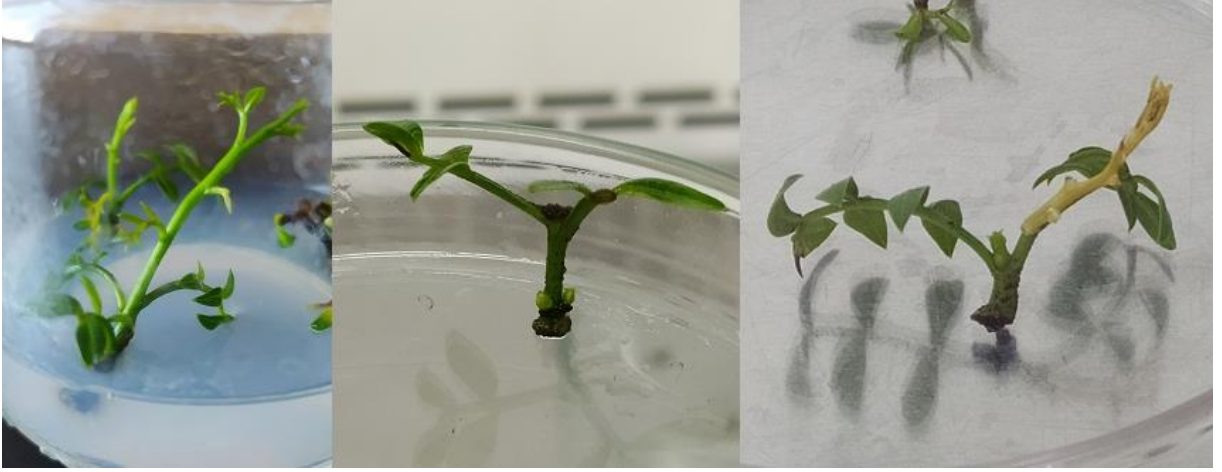
Aralık dönemi örneklerine ait alt kültürlerde (II. aşama), 43 eksplant içerisinde 4 adet adventif tomurcuk oluşumu (%9,3) ve yine 4 adet (%9,3) sürgün gelişimi (boy uzaması)

görülmüştür (Resim 4.5). Ocak ayının ikinci aşamasında ise 113 eksplantın 58'inde (%51,33) adventif tomurcuk oluşumu gözlemlenirken varolan sürgünlerde boy uzaması veya normal, sağlıklı bir gelişim olmamıştır. Ocak döneminin II. aşamasında tüm genotiplerde iki hafta içerisinde tomurcuk oluşumu görülürken, sırasıyla, yüzde tomurcuk oluşturan eksplant oranları %75,00; %43,75; %72,22; %20,51 olarak belirlenmiştir. Aktif karbonlu, düşük şeker ve mineral tuzları içeren başlangıç uygulamalarından (A grubu) aktarılan eksplantların görece düşük tomurcuk oluşturma performansı dikkat çekmiştir (Çizelge 4.6). Herhangi bir sürgün gelişimi veya oluşumu tespit edilmediğinden Kasım dönemine dair bulgulara çizelgede yer verilmemiştir.

Çizelge 4.6. Eksplantların sürgün geliştirme ve tomurcuk oluşturma performansları.

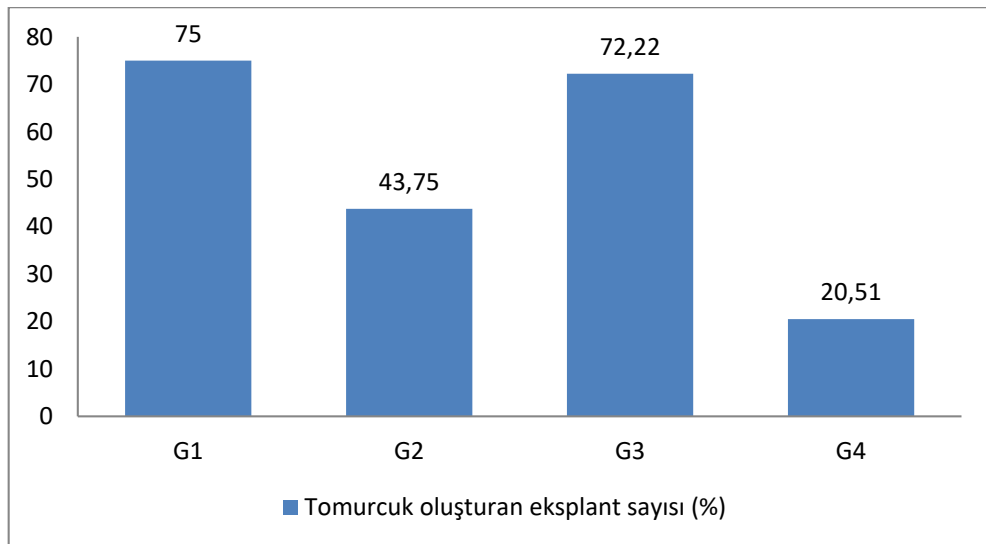
Dönem	G. <sup>1</sup>	B.U. <sup>2</sup>	%S.G.G.E.O. <sup>3</sup> (S.G.G.E.S. <sup>4</sup> )	%T.O.E.O. <sup>5</sup> (T.O.E.S. <sup>6</sup> )	E.B.D.T.S. <sup>7</sup> (O.T.S. <sup>8</sup> )	T.E.S. <sup>9</sup>	
Aralık	G1	A+	%0,00 (0)	%0,00 (0)	0,00 (0)	3	
		P+	%0,00 (0)	%0,00 (0)	0,00 (0)	3	
	G3	K+	%0,00 (0)	%0,00 (0)	0,00 (0)	4	
		A+	%0,00 (0)	%0,00 (0)	0,00 (0)	3	
	G4	K+	%28,60 (2)	%14,30 (1)	0,14 (1)	7	
		A+	%0,00 (0)	%0,00 (0)	0,00 (0)	8	
		P+	%0,00 (0)	%16,70 (1)	0,17 (1)	6	
		S+	%22,20 (2)	%22,20 (2)	0,22 (2)	9	
	Ocak	G1	K+	%0,00 (0)	%90,00 (9)	0,90 (9)	10
			A+	%0,00 (0)	%66,70 (8)	0,67 (8)	12
P+			%0,00 (0)	%71,40 (5)	1,00 (7)	7	
S+			%0,00 (0)	%72,70 (8)	0,73 (8)	11	
G2		K+	%0,00 (0)	%66,70 (2)	0,67 (2)	3	
		A+	%0,00 (0)	%0,00 (0)	0,00 (0)	7	
		P+	%0,00 (0)	%83,30 (5)	1,83 (11)	6	
G3		K+	%0,00 (0)	%100 (6)	1,00 (6)	6	
		A+	%0,00 (0)	%58,30 (7)	0,58 (7)	12	
G4		K+	%0,00 (0)	%0,00 (0)	0,00 (0)	8	
		A+	%0,00 (0)	%0,00 (0)	0,00 (0)	9	
		P+	%0,00 (0)	%30,80 (4)	0,31 (4)	13	
		S+	%0,00 (0)	%44,40 (4)	0,44 (4)	9	

1. Genotipler
2. Başlangıç uygulamaları
3. % Sürgün gelişimi gösteren eksplant oranı (Sürgün gelişimi gösteren eksplant sayısı / Toplam eksplant sayısı)
4. Sürgün gelişimi gösteren eksplant sayısı
5. % Tomurcuk oluşturan eksplant oranı (Tomurcuk oluşturan eksplant sayısı / Toplam eksplant sayısı)
6. Tomurcuk oluşturan eksplant sayısı
7. Eksplant başına düşen tomurcuk sayısı (Oluşan tomurcuk sayısı / Toplam eksplant sayısı)
8. Oluşan tomurcuk sayısı
9. Toplam eksplant sayısı



Resim 4.5. Eksplantlarda gözlemlenen sürgün gelişimi (sol) ve tomurcuk oluşumları (orta ve sağ).

BAP (1 mg/l) ve GA<sub>3</sub> (0,5 mg/l) destekli MS besi ortamlarında oluşan tomurcukların sürmedikleri veya anormal bir gelişim göstererek çok kısa kaldıkları tespit edilmiştir. Yapılan iki yönlü ANOVA test sonuçlarına göre, dönem faktörünün eksplantların tomurcuk oluşturması üzerine etkisinin çok önemli ( $p < 0,001$ ) olduğu belirlenmiştir. Genotiplerin, ocak döneminin ikinci aşamasında tomurcuk oluşturan eksplant oranlarının karşılaştırılması Şekil 4.3’de verilmiştir. Uygulanan Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.7’de ve varyans analizi sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı genotiplerde tomurcuk oluşturan eksplant oranları (%)

Çizelge 4.7. Tomurcuk oluşumlarına dair Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları.

Dönem	Tomurcuk Oluşumu	Genotip	Tomurcuk Oluşumu
Kasım	0.00 b	1	1.58 a
Aralık	0.25 b	2	1.00 a
Ocak	1.41 a	3	1.44 a
		4	0.39 b

Çizelge 4.8. Tomurcuk oluşumlarına dair varyans analiz sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Tip III Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri	Önemlilik
Düzeltilmiş Model	44,117 <sup>a</sup>	9	4,902	9,261	< 0,001
Kesme Noktası	8,256	1	8,256	15,598	< 0,001
Dönem	18,018	2	9,009	17,021**	< 0,001
Genotip	2,267	3	0,756	1,428	0,244
Dönem x Genotip	9,549	4	2,387	4,510	0,003
Hata	29,641	56	0,529		
Toplam	132,000	66			
Düzeltilmiş Toplam	73,758	65			

a. R Kare = 0,598 (Düzeltilmiş R Kare = 0,534)

\*\* p < 0,001 önem düzeyinde anlam belirtir.

#### 4.6. Çelik Alınan Dönem ve Genotipin Köklenme ve Kallus Oluşumu Üzerine Etkisi

IBA (2 mg/l) destekli MS ortamlarına alt kültüre alınan eksplantların %38,64'ü kallus oluştururken, 3 numaralı genotipe ait eksplantlarda hiç kalluslaşma görülmemiştir. Kalluslar, istisnasız şekilde dökülen sürgün uçlarının yara yerlerinden gelişmiştir (Resim 4.6). Oluşan kalluslar, orta sertlikte ve süngerimsi yapıda olup kahverengi bir görünüm almışlardır. III. aşamaya alınan eksplantların neredeyse tamamının dip kısımlarında, 3-4 haftalık süre sonunda belirgin şekilde şişkinlik ve odunlaşma, sertleşme gözlemlenmiştir. Köklenme ise %61,54'lük oran ve 2,69'lük köklenen eksplant başına düşen ortalama kök sayısı ile yalnızca 4 numaralı genotipte görülmüştür (Resim 4.7). Primer kökler oluşturan 16 eksplant içerisinde yeterli boya sahip, sağlıklı görülen 4 bitki torf ortamlara aktarılmış fakat dış ortama adaptasyonları sağlanamamıştır. İn vitro ortamlardaki köklenmeyen eksplantların dokular üzerinde gittikçe yayılan kararmalar neticesinde gelişimleri tamamen durmuş veya canlılıklarını kaybetmişlerdir.



Resim 4.6. Eksplant gövdeleri üzerinde meydana gelen kallus oluşumları.



Resim 4.7. Köklenmiş olgun sakız ağacı eksplantlarına ait yandan (solda) ve alttan (sağda) görünüm.

Kasım döneminde hiç eksplant kültüre alınmadığı için, aralık döneminde ise 1, 3 ve 4 numaralı genotiplerden kültüre alınan; sırasıyla 3, 4 ve 1 adet eksplantta da kallus oluşumu veya köklenme görülmediği için III. aşamaya dair bulguların verildiği Çizelge 4.9'da yalnızca ocak dönemine dair veriler yer almıştır. İstatistiksel anlamda genotipin, hem kallus hem de kök oluşumu üzerine etkisi, çok önemli ( $p < 0,001$ ) bulunmuştur. Yapılan tek yönlü ANOVA test sonuçları Çizelge 4.10'da sunulmuştur.



Çizelge 4.9. Genotiplerin kallus ve kök oluşturma yüzdeleri ile Duncan testi sonuçları.

G. <sup>1</sup>	%K.O. <sup>2</sup> (K.O.E.S. <sup>3</sup> )	Duncan Sonuçları	%Kök.O. <sup>4</sup> (K.E.S. <sup>5</sup> )	Duncan Sonuçları	O.K.S. <sup>6</sup> (T.K.S. <sup>7</sup> )	T.E.S. <sup>8</sup>
G1	%70,27 (26)	1,86 a	%0,00 (0)	0,00 b	0 (0)	37
G2	%40,00 (4)	1,00 b	%0,00 (0)	0,00 b	0 (0)	10
G3	%0,00 (0)	0,00 c	%0,00 (0)	0,00 b	0 (0)	15
G4	%15,38 (4)	0,40 bc	%61,54 (16)	1,60 a	2,69 (43)	26

1. Genotipler

2. % Kallus oluşumu (Kallus oluşturan eksplant sayısı / Toplam eksplant sayısı)

3. Kallus oluşturan eksplant sayısı

4. % Köklenme oranı (Köklenen eksplant sayısı / Toplam eksplant sayısı)

5. Köklenen eksplant sayısı

6. Ortalama kök sayısı (Toplam kök sayısı / Köklenen eksplant sayısı)

7. Toplam kök sayısı

8. Toplam eksplant sayısı

Çizelge 4.10. Kallus ve kök oluşumlarına dair varyans analiz sonuçları.

	Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri	Önemlilik
Kallus Oluşumu	Gruplar Arası	19,886	3	6,629	14,089**	< 0,001
	Gruplar İçi	14,114	30	0,470		
	Toplam	34,000	33			
Köklenme	Gruplar Arası	18,071	3	6,024	41,070**	< 0,001
	Gruplar İçi	4,400	30	0,147		
	Toplam	22,471	33			

\*\* p < 0,001 önem düzeyinde anlam belirtir.

## 5. TARTIŞMA

Sakız ağaçlarının farklı genotiplerinden alınan çeliklerde ortalama 2,38 ila 9,2 adet yeni sürgünler meydana gelmiştir. Ağaç üzerindeki sürgünlerinin uzun boğum araları, seyrek dallanma ve yapraklanma yapısıyla 3 numaralı genotip, en az miktarda sürgün meydana getiren genotip olmuştur. Farklı genotiplerin doğal ortamda sergiledikleri özellikler ve rejenerasyon kabiliyetleri üzerinden eksplant kaynağı olarak kullanılacak çeliklerin sürme kapasitelerine dair çıkarımların yapılabileceği görülmektedir. Tüm genotiplerin ortalaması alındığında, çelik başına düşen ortalama sürgün değeri 6,57 ile ocak ayında en yüksek seviyede bulunurken, örnek alım dönemleri itibarıyla eksplantların canlılık ve alt kültüre alınma oranı da gittikçe artmıştır. Bu çalışmada elde edilen %82,5'lük çelik sürme oranı, Çalar vd. (2016)'nin belirttiği ortalama değerden (%40-50) yüksek çıkmıştır. Yine aynı araştırmacıların da çelik aldıkları ocak ayı, kültürlerin devam eden seyirleri de dikkate alındığında en başarılı dönem olarak gözükmektedir.

Aralık döneminde ortalama enfekte eksplant oranı %6,11 olurken, kasım ve ocak aylarında sırasıyla %21,33 ve %21,54 olduğu görülmüştür. Bu durumun; kasım ve ocak döneminde çelik alınan günlerin yağışlıyken, aralık döneminde rüzgarlı ve kuru bir havada olmasıyla paralellik göstermesi dikkat çekmiştir. Alınan bitkisel materyal üzerindeki mevcut yüksek nemin, laboratuvara taşıma koşullarındaki yüksek nemlilik ile buluşmasının bu farkı açıklayabileceği düşünülmüştür. En düşük ortalama enfeksiyon değeri %6,67 ile 3 numaralı genotipte tespit edilirken, %27,41 oranıyla 2 numaralı genotip, en yüksek ortalama enfeksiyon değerine sahip genotip olarak ortaya çıkmıştır. Bu durum da yine ağaçların dallanma şekli, form ve dolayısıyla havalanma kapasitesini akla getirmiştir. Daha seyrek, ince dal ve yapraklara sahip 3 numaralı genotip çeşitli fungal hastalık etmenlerine karşı daha yüksek bir havalanma ve güneşlenme imkanına sahipken 2 numaralı genotipte dallanma ve yapraklanma son derece kompakttır ve hiç güneş, rüzgar almayan bölgeler mevcuttur.

Bu çalışmanın sterilizasyon aşamasında tercih edilen 10 dk, %15'lik NaOCl uygulaması ardından dikim yapılan 540 eksplanttan 362'sinde (%67,04) kararma görülmüştür. Kararmalar çoğunlukla düşük şiddette ve eksplantların kesilen dip kısımlarında sınırlı kalsa da bu sonuç, Onay vd. (2014) ile Çalar vd. (2016)'nin paylaştığı 20 dk, %15'lik NaOCl neticesinde %26,67 veya 10 dk, %10'luk NaOCl neticesinde %0,00'lık kararma oranlarıyla pek örtüşmemektedir. Sterilizasyon işlemleri arasında; çalkalayıcı (150 rpm) yerine elle çalkalama dışında bir fark

bulunmamaktadır. Fakat buna eksplantlarda görülen kararma şiddetlerinin değerlendirilmesini de eklemek gerekmektedir. Bu çalışmada, kararmalar var/yok şeklinde değil dört kademeli bir derecelendirme üzerinden yorumlanmış ve düşük şiddette de olsa göz ardı edilmemiştir. Kararma şiddetinin genotip faktörü ile korelasyonuna veya daha verimli olduğu bilinen genotiplerin daha şiddetli karardıklarına dair bir bulgu elde edilmemiştir. Eksplantlardaki kararmalar, istatistiksel anlamda dönem ve genotipten etkilenmemiştir. Diğer taraftan, başlangıç uygulamalardan biri olan parafinin eksplantların bazal kısımlarını kaplayarak fenolik madde salınımını kestiği belirlenmiş fakat geçici bir strateji olarak düşünüldüğünden ötürü alt kültürlerde uzaklaştırıldığında yeniden kararma belirtileri görülmüştür.

İn vitro kültürlerle başlangıç uygulamalarından biri olarak kullanılan aktif karbonlu, yarım kuvvette ve kontrol grubuna göre daha düşük miktarda şeker (sukroz) içeren besi ortamı kullanımı beklenen etkiyi göstermemiştir. Bu uygulama gruplarından aktarılan eksplantların görece düşük tomurcuk oluşturma performansı da dikkat çekmiştir. Aktif karbon, fenolik bileşikler ile toksik ürünlerin yanı sıra ortamlardaki oksin (IAA, NAA, IBA), sitokinin (BAP, kinetin) ve besin elementlerini de adsorbe edebilmektedir (Pan ve Van Staden, 1998). Pan ve Van Staden (1998)'in aktardığına göre, *Eucalyptus citriodora* Hook.'da aktif karbon kullanımıyla sürgün sayısı azalmış (Ahuja, 1985) ve benzer şekilde *Pinus strobus* L.'da BAP içeren besi ortamlarına aktif karbon ilavesiyle sürgün oluşumunda azalma bildirilmiştir (Webb vd., 1988).

İn vitro kültürlerin başlatılmasından itibaren sürgün uçları ve yapraklarda kademeli olarak önce kloroz, ardından nekroz ve dökülmeler görülmüştür. Özellikle sürgün uçlarından başlayarak diğer kısımlara yayılan ve etkisini gittikçe arttıran semptomlar nedeniyle kayıplar (ölüm) yaşanmıştır. Sürgün ucu nekrozu, odunsu biki türlerinin in vitro kültürlerinde yaygın şekilde karşılaşılan fizyolojik bir rahatsızlıktır (Surakshitha vd., 2019). Çeşitli çalışmalar incelendiğinde oksidatif stres, sitokininler, spesifik bir besin elementi (özellikle demir, kalsiyum, bor gibi hareketsiz olanlar) veya mineral tuza karşı gelişen hassasiyet, kök sisteminin bulunmayışı, hiperhidrasyon, ortamdaki gaz alışverişinin kısıtlı oluşu ve etilen birikimi, dolaylı veya direkt olarak sürgün uçlarında görülen kloroz ve nekrozun olası nedenleri arasında olduğu görülmektedir. Özellikle oksidatif stres, sayılan diğer problemlerle sebep veya sonuç ilişkisi içinde olmasıyla önemli ve tetikleyici bir roldedir (Cassells ve Curry, 2001). Fakat ortam bileşenlerinin veya genel bir ifadeyle koşulların, sürgün ucu nekrozuna olan etkisine dair farklı türlerde çelişkili örnekler mevcuttur ve dolayısıyla karmaşık bir problem olarak nitelendirilmektedir (Bairu vd., 2009). Bu konuda eksplant

kaynağı olan bitkilerin durumu dahi incelemeye değer görünmektedir zira bu çalışmada kullanılan bahçedeki genç ağaçlarda neredeyse tüm yaprakları etkisi altına alan bir kloroz söz konusudur.

*Trichosanthes dioica*'da sürgün ucu nekrozu, kalsiyum eksikliğine bağlı bulunmuştur ve ortama eklenen kalsiyum klorür takviyesiyle ortadan kaldırılmıştır (Kishore vd., 2015). Kültür ortamlarında karşılaşılan sürgün ucu nekrozunun arttırılan kalsiyum veya bor konsantrasyonlarıyla kontrol altına alındığını bildiren başka araştırmalar da mevcuttur (Bairu vd., 2009; Surakshitha vd., 2019). *Vaccinium myrtillus* (yaban mersini) ve *Vaccinium pahalae* türlerinde demir (Fe) elementi kaynağı ve konsantrasyonunun kloroz ile etkileşiminin araştırıldığı çalışmada, FeEDDHA'nın FeEDTA'ya alternatif veya birlikte kullanımıyla sorun ortadan kalkmıştır (Shibli vd., 1997). Donnini vd. (2008), ayva (*Cydonia oblonga* Mill.) ve armutta (*Pyrus communis* L.) karşılaştıkları kloroz problemini, eksplantların kök sistemine sahip olmamalarından ötürü demir eksikliği göstermelerine bağlamıştır. Red Globe (üzüm) kültür varyetesine ait sürgün uçlarında yapılan bir çalışmada nekrotik sürgün ucu oranı, 1 mg/l BAP içeren yarım kuvvette MS ortamında %30,44 iken 3 mg/l BAP destekli tam kuvvette MS ortamında %65,00'in üzerinde bulunmuştur (Surakshitha vd., 2019). *Cercis canadensis* (Kanada erguvanı)'de artan 2iP (2-izopentenil adenin) ve kinetin dozlarının (1 ila 15 mg/l arası değerlerde), sürgün ve yapraklarda gittikçe şiddetlenen bir sararma ve nekroz meydana getirdiği bildirilmiştir (Mackay vd., 1995). Onay (2016), antep fıstığında BAP varlığının sürgün uçlarındaki nekrozu etkilediğini, sitokinin içermeyen ortamlarda sürgün ucu nekrozunun daha az olduğunu fakat farklı BAP konsantrasyonlarının (1-8 mg/l) etkileri arasında önemli bir fark olmadığını bildirmiştir. Yine aynı araştırmacı nekrotik sürgün ucu oranını MS ortamında %9,1 ve WPM ortamında %17.7 olarak tespit etmiştir. Antep fıstığında yapılan bir başka çalışmada, MS besi ortamına göre 3'te 1 oranında daha az kalsiyum klorür dihidrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) içeren ortamda, yapraklarda görülen kloroz ile sürgün ucu nekrozunun azaldığı görülmüş ve artan kalsiyum klorür dozu, sürgün gelişimine zarar vermiş, klorozu şiddetlendirmiştir. Buna ilaveten, alt kültüre alma aralığının 4-6 haftadan 3 haftaya indirilmesiyle problem çözülmüştür (Dolcet Sanjuan ve Claveria, 1995).

Bu çalışmadaki sakız ağacı eksplantlarında karşılaşılan durumun ise, çeliklerin bekletildikleri saf suda veya başlangıç kültürlerinde hiç sitokinin (BAP) kullanılmaması ile yakın ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Oksidatif stres etkisi akla gelse de kararmanın neredeyse hiç görülmediği parafinli başlangıç uygulamalarında da sürgün uçlarının sararması ve dökülmesi, bu ihtimali desteklemektedir. Ortamlarda sitokinin (1 g/l BAP) kullanılan ön

deneylerde (bulgularına burada yer verilmeyen) yoğun kloroz ve sürgün ucu nekrozu yaşanmazken dip kısımlardan yayılan çok daha şiddetli bir ortam ve eksplant kararması ile karşılaşmıştır. Mascarello vd. (2007) de yüksek BAP seviyelerinin hiperhidrasyon, kararma ve sürgün boyunu azaltıcı etkilerde bulunabileceğini belirtmişlerdir. Farklı bir perspektifle, sorunun oksidatif stres ve sitokinin ilişkisinin sonucu olduğu da söylenebilir. Buna göre, BAP yokluğunda oksidatif stresin tesiri yoğun şekilde sürgün uçlarında meydana gelmektedir. Perez Tornero ve Burgos (2000), dikim öncesi kayısı sürgün uçlarını BAP solüsyonuna daldırarak apikal nekrozu dindirmiştir. Dolayısıyla, ters orantılı şekilde işleyebileceği tahmin edilen kararma ve sürgün gelişimi dengesi açısından kültürlerde uygun düşük dozlarda BAP kullanımının veya verilen örnekteki gibi alternatif çözümlerin fark yaratabileceği düşünülmektedir. Kishore vd. (2015), ortamdaki düşük sitokin varlığının, endojen sitokin biyosentezinin gerçekleştiği köklerin yokluğu ile birleştiğinde sürgün ucu nekrozunun şiddetlendiğini bildirmiştir.

Tomurcuk oluşturan eksplant oranı, sırasıyla, genotipler arasında %75,00; %43,75; %72,22; %20,51 olarak belirlenmiştir. Diğer genotiplere oranla sürgün uçlarını etkileyen fizyolojik bozukluklardan daha az etkilenen 4 numaralı genotipin köklenme gösterirken tomurcuk oluşum oranında görece düşük kalmasının, eksplant bünyesindeki hormon dengesine işaret ettiği ileri sürülebilir. Oksin ve sitokinlerin dozları ile kombinasyonları, bitki rejenerasyonunu sağlamada çoğu zaman kritik bir rol oynamaktadır (Pan ve Van Staden, 1998). Oksinler; meristemik bölgeler, koleoptil uçları, kök uçları, çimlenen tohumlar, apikal tomurcuklar ve genç yapraklar gibi aktif olarak büyüyen kısımlarda sentezlenirler. Floem vasıtasıyla taşınarak hücre uzaması, kök oluşumu gibi rollerle bütün bir bitkiyi etkileme kapasitesine sahiptirler. Ayrıca aksiller tomurcukları baskılayarak apikal dominansiye sebep olurlar (Hopkins ve Hüner, 2008). Sitokinler ise adventif tomurcuk oluşumu sağlarlar (Lavakumaran ve Seran, 2014). Bitki gelişiminde çeşitli rol ve fonksiyonlara sahip olduğundan dolayı sürgün uçlarında meydana gelen herhangi bir anormallik, bir dizi fizyolojik olayı olumsuz etkilemektedir. Gittikçe şiddetlenen ve ilk belirtilerden 5 hafta sonra *Trichosanthes dioica* kültürlerinde %80 oranında ölüm meydana getiren sürgün ucu nekrozu, köklenmeyi ve kök gelişimini de olumsuz etkilemiştir (Kishore vd., 2015). *Harpagophytum procumbens*'de sürgün ucu nekrozu, önce apikal tomurcukların ölümü sonra da yanal tomurcukların oluşumuyla sonuçlanmıştır (Bairu vd., 2009). Kültür ortamlarının ikinci aşamasında yararlanılan sitokinle birlikte, sakız ağacı eksplantlarının, zarar gören sürgün uçları sonrası köklenmeden ziyade tomurcuk oluşturma ve sürgün gelişimi yönünde bir eğilim

gösterdikleri söylenebilir. Sonrasında ise kültürlerin III. aşamasında kesilen 1 mg/l sitokinin desteği ve 2 mg/l konsantrasyonunda sağlanan oksin içeriği, oluşan adventif tomurcukların dormant hale geçmesine sebebiyet vermiş olabilir.

Tüm dönemler değerlendirildiğinde, alt kültüre (II. aşamaya) alınan eksplantların 85 adeti yani yaklaşık yarısı (%47,49) 4 numaralı genotipe aittir. Sakız ağacının yabani genotipinden elde edilen başarıya benzer şekilde, diğer bazı bitki türlerinin doku kültürlerinde de yabani genotip veya kültüre alınmamış akraba türler, kültür varyeteleri ve ticari çeşitlerden daha başarılı olmaktadır. Yulaf, domates ve patatesten yabani genotiplerin daha üstün rejenerasyon kapasitelerini ortaya koymuş örnek çalışmalar mevcuttur (Lech vd., 1996; Rokka vd., 1996; Kiviharju vd., 1998).

III. aşamaya alınan eksplantların neredeyse tamamının dip kısımlarında, 3-4 haftalık süre sonunda belirgin şekilde şişkinlik ve sertleşme gözlemlenmiştir. Köklenme ise %61,54'lük oran ve 1,65'lik eksplant başına düşen ortalama kök sayısı ile yalnızca 4 numaralı genotipte gerçekleşmiştir. Yabani genotipin daha az fenolik bileşik salgıladığı veya daha az kararma gösterdiği için köklendiği gibi bir çıkarımda bulunmak mümkün görünmemektedir. Kılınç (2013), in vitro ortamda çimlendirilmiş tohumlardan gelişen 4 farklı juvenil genotip üzerinde yaptığı köklendirme deneyinde, oksin içermeyen ortamda elde edilen %25 oranındaki köklenme dahil (sadece bir genotipte) %0,00 ila 94,15 oranlarında değişen köklenme oranları tespit etmiştir. Kostas vd. (2016), 4 g/l K-IBA (indol-3-bütirik asit potasyum tuzu) uygulaması için sakız ağacının 4 farklı kültür klonu çeliklerinde elde ettiği %80,0; %52,5; %40,0 ve %5,0'lik köklenme oranlarıyla, genotip faktörünün köklenmede önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir. İsfendiyaroğlu (2003)'na göre, sakız ağacı çeliklerinin köklendirilmesi için 20.000 ppm ve üstü yüksek IBA dozları gerekli görünmektedir. Bu durum dikkate alındığında bu çalışmadaki diğer genotiplere ait eksplantların da köklendirilmesi için 2 mg/l üstündeki IBA dozlarının işe yarayabileceği öngörülmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sakız ağacını konu alan çeşitli doku kültürü çalışmalarında, özellikle de tohum ve tohumdan gelişen juvenil bitki dokularının kullanıldığı çalışmalarda başarılı sonuçlar bulunmaktadır. Fakat bu çalışmalarda eksplant seçiminden ötürü klonal bir çoğaltımın söz konusu olmaması, somaklonal varyasyonların meydana gelmesi ve gelişen bitkilerin cinsiyetinin belirmemesi gibi bazı sakıncalar bulunmaktadır. Yetiştirilmesi uzun yıllar alan bu ağaçların, agronomik performanslarının belirli standartları karşılayabilmesi için klonal çoğaltım mecburiyeti bulunmaktadır. Alternatif olarak çalışılan, in vitro ortamlarda sakız ağacı sürgünlerinin akraba türlere mikroaşılınması ise; reçinenin toprak özelliklerinden direkt olarak etkilendiği yönündeki görüşleri ve anaç-kalem etkileşiminin reçine verimi ile kalitesini nasıl etkileyeceği sorusunu akla getirmektedir. Bununla birlikte mikroaşılama çalışmalarında kullanılan anaçların in vitro ortamda çimlendirilmiş tohumlardan elde edilmesi, anaçların tam bir homojenlik göstermeyeceği anlamına gelmektedir.

Bu çalışma sonucunda, olgun sakız ağaçlarına ait sürgün ucu eksplantlarında adventif tomurcuk oluşumları sağlanmış ve köklenme görülmüştür. Yabani genotipte sağlanan köklenme başarısı, kültür klonlarına ait sürgün uçlarının, akraba türler yerine köklendirilmiş yabani genotip eksplantları üzerine mikroaşılınmasının mümkün olduğunu göstermektedir. Geliştirildiği taktirde bu yöntemin, anaçların da homojenlik gösterecek olmasıyla sakız ağaçlarının ticari mikroçoğaltımı için en makul metod olarak ön plana çıktığını söylemek yanlış olmayacaktır. Araştırma neticesinde öne çıkan ocak dönemi ve 4 numaralı genotip, öngörüldüğü gibi farklı dönem ve genotip seçeneklerinin etkisini ve önemini ortaya koymuştur.

Bundan sonraki çalışmalarda olgun sakız ağaçlarının mikroçoğaltımında, çeliklerin bekletildiği suda veya başlangıç kültür ortamlarında düşük konsantrasyonlarda sitokinin kullanımının ve ilk kültür sürelerinin kısa tutulmasının (7 gün) faydalı olabileceği düşünülmektedir. Kararma ve sürgün uçlarındaki gelişim dengesi açısından uygun BAP konsantrasyonunun çalışılması gerekli görülmektedir. Bu denge hali sağlandığı taktirde, yani sağlıklı sürgün uçlarının varlığında, bitkilerin göstereceği düşük şiddette kararmaların da göz ardı edilebileceği düşünülmektedir. Böylelikle, halihazırda etkinliği zayıf kalan kararmayı engellemeye yönelik çeşitli stratejilere belki de ihtiyaç kalmayacaktır. Fakat parafin uygulamasının alt kültürlerde de kullanılması halinde fark yaratma olasılığı bulunmaktadır.

Bununla birlikte, besi ortamına oksidatif enzim (fenilalanin amonyum liyaz, polifenol oksidaz, peroksidaz) inhibitörlerinin ilave edilmesi, eksplantların sık aralıklarla taze besi ortamlarına aktarılması veya eksplantların yüzey sterilizasyonunda NaOCl yerine bitki dokularına zarar vermeyen gümüş nanopartiküllerinin (AgNP) kullanılması gibi yöntemler denenmeye açıktır. Köklenme aşamasında ise farklı genotiplerin ve daha yüksek dozda IBA konsantrasyonlarının çalışılması yerinde olacaktır.

Sonuçlar, yüksek verimli klonların mikroçoğaltımı konusunda umut verici olmuştur. Piyasadaki fidan ihtiyacının karşılanması halinde; ülkemizde sakız ağacı yetiştiriciliğini tesis etmeye yönelik ciddi ivme kazanan yatırım, teşvik ve hedeflerle, halen tamamına yakını ithal edilmekte olan damla sakızına ödenen dövizden önemli ölçüde tasarruf edilecek ve üreticilerine önemli bir gelir kaynağı olacaktır. Ayrıca, Sakız Adası'nda yaşanan sosyoekonomik problemlerle birlikte düşünüldüğünde, rekabet koşullarının orta ve uzun vadede Türkiye lehine gittikçe iyileşeceği öngörülmektedir.



## KAYNAKLAR

- Abdelkader, H., Nadia, K., Salima, B. (2016). Chemical Composition and Antioxidant Potential of *Pistacia lentiscus* L. Essential Oil from Oran (Algeria). *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 7, 539-544.
- Ahuja, A. (1985). In Vitro Shoot Differentiation in *Eucalyptus citriodora* Hook: Effect of Activated Charcoal. *Indian Journal of Forestry*, 8, 340-341.
- Akdemir, Ö.F. (2013) *İn Vivo Ve İn Vitro Şartlarda Yetiştirilen Pistacia Lentiscus L. (Sakız Ağacı)'nın Yağ Asiti ve Uçucu Yağ İçeriklerinin Belirlenmesi* Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Akkuş, H. (2018) *Bazı Ağır Metal Uygulamalarının İn Vitro Ortamda Çoğaltılmış Juvenil Pistacia Lentiscus L. (Sakız Ağacı) Eksplantlarında Triterpenoit Miktarları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi* Yüksek Lisans Tezi, Batman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Alp, H.A., Düzyaman, E., Özzambak, E. (2010). İn Vitro'da Kültüre Alınan Enginar Sürgün Uçlarında Sağlıklı Gelişim Oranını Arttırma Olanakları Üzerinde Bir Araştırma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 47(2), 113-122.
- Al-Saghir, M.G., Porter, D.M. (2012). Taxonomic Revision of the Genus *Pistacia* L. (*Anacardiaceae*). *American Journal of Plant Sciences*, 3, 12-32.
- Altunok, A., Er, C. (2013). Bazı Şeker Pancarı (*Beta vulgaris* L.) Hatlarında İn Vitro Adventif Sürgün Rejenerasyonu. *Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 23(2), 27 – 35.
- Amhamdi, H., Aouinti, F., Wathelet, J.P., Elbachiri, A. (2009). Chemical Composition of the Essential Oil of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. *Records of Natural Products*, 3(2), 90- 95.
- Bairu, M.W., Jain, N., Stirk, W.A., Dolezal, K., Van Staden, J. (2009). Solving The Problem of Shoot-Tip Necrosis in *Harpagophytum procumbens* by Changing The Cytokinin Types, Calcium and Boron Concentrations in The Medium. *South African Journal of Botany*, 75(1), 122-127.

- Baydar, N. (2006). Phenolic Compositions of Grapevine Shoot Tips Collected in Different Months and Their Effects on The Explant Browning, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20(1), 41-46.
- Baytop, T. (1968). Türkiye’de Sakız (Mastiks) Elde Etme İmkanları. *İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mecmuası*, 4, 31-35.
- Ben Douissa, F., Hayder, N., Chekir Ghedira, L., Hammami, M., Ghedira, K., Mariotte, A.M., Dijoux Franca M.G. (2005). New Study of The Essential Oil from Leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia, *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 410-414.
- Bhat, R.S., Chandel, K.P.S. (1991). A Novel Technique to Overcome Browning in Tissue Culture, *Plant Cell Reports*, 10, 358-361.
- Boelens, M.H., Jimenez, R. (1991). Chemical Composition of The Essential Oils from The Gum and From Various Parts of *Pistacia lentiscus* L. (Mastic Gum Tree). *Flavour and Fragrance Journal*, 6(4), 271-275.
- Boudabous, M., Mars, M., Marzougui, N., Ferchichi, A. (2010). Micropropagation of Apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) Through In Vitro Culture of Axillary Buds, *Acta Botanica Gallica*, 157(3), 513-524.
- Boztok, Ş. (2007). Doğal Sakız Bitkileri (*Pistacia lentiscus* L.)’nin Ekonomiye Kazandırılması. *Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi Bülteni*, Yayım Bülteni No: 51, ISSN: 1300-3518.
- Browicz, K. (1987). *Pistacia lentiscus* cv. Chia (Anacardiaceae) on Chios island. *Plant Systematics and Evolution*, 155(1-4), 189–195.
- Cassells, A.C., Curry, R.F. (2001). Oxidative Stress and Physiological, Epigenetic and Genetic Variability in Plant Tissue Culture: Implications for Micropropagators and Genetic Engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(2), 145-157.
- Castola, V., Bighelli, A., Casanova, J. (2000). Intraspecific Chemical Variability of The Essential Oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(1), 79-88.
- Chen, G., Chen, D., Wang, T., Xu, C., Li, L. (2012). Analysis of The Proteins Related to Browning in Leaf Culture of *Phalaenopsis*. *Scientia Horticulturae*, 141, 17-22.

Çalar, N., Yıldırım, H., Onay, A. (2016). Erkek ve Dişi Sakız Ağaçlarının (*Pistacia lentiscus* L.) Çeliklerinden Zorlama Teknikleri Yoluyla İn Vitro Kültürlerin Başlatılması, *Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, Cilt:45, Özel Sayı, 899-904, ISSN 1300-8943.

Çölgeçen, H., Koca, U., Toker, G. (2011). Influence of Different Sterilization Methods on Callus Initiation and Production of Pigmented Callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turkish Journal of Biology*, 35, 513-520.

Das, P., Srivastav, A.K. (2015). To Study The Effect of Activated Charcoal, Ascorbic Acid and Light Duration on In Vitro Micropropagation of *Aloe vera* L. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 4(5), 3131-3138.

Demir, E. (2018). *Aksenik Juvenil Sakız Ağacı (Pistacia Lentiscus L.) Eksplantlarından Kallus Kültürlerinin Başlatılması Ve Optimizasyonu* Yüksek Lisans Tezi, Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Batman.

Dimas, K.S., Pantazis, P., Ramanujam, R. (2012). Chios Mastic Gum: A Plant-Produced Resin Exhibiting Numerous Diverse Pharmaceutical And Biomedical Properties. *In Vivo*, 26(5), 777-785.

Dobranszki, J., Teixeira da Silva, J.A. (2010). Micropropagation of Apple - A Review. *Biotechnology Advances*, 28(4), 462-488.

Dolcet Sanjuan, R., Claveria, E. (1995). Improved Shoot-Tip Micropropagation of *Pistacia vera* L. and The Beneficial Effects of Methyl Jasmonate. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(6), 938-942.

Donnini, S., Cinelli, F., Sensale, L., Muleo, R., Zocchi, G., Ranieri, A. (2008). Pear Plantlets Cultured 'In Vitro' Under Lime-Induced Chlorosis Display A Better Adaptive Strategy Than Quince Plantlets. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture*, 93(2), 191-200.

Ersalı, Y., Özen, H.Ç., Onay, A., Tilkat, E. (2017). Olgun Dişi Buttum (*Pistacia khinjuk* Stocks) Ağaçlarından İn Vitro Kültürlerin Başlatılması. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 7(1/2).

Fascella, G., Airo, M., Zizzo, G., Ruffoni, B. (2004). Preliminary Studies on In Vitro Cultivation of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.), *Italus Hortus*, 11(4), 141-143.

Fernandez, A., Camacho, A., Fernandez, C., Perez, P., Altarejos, J. (2000). Composition of The Essential Oils from Galls and Aerial Parts of *Pistacia lentiscus* L. *Journal of Essential Oil Research*, 12(1), 19-23.

Hopkins, W.G., Hüner, N.P.A. (2008). *Introduction to Plant Physiology* (4<sup>th</sup> ed.). New York (USA): John Wiley & Sons. ISBN 978-0-470-24766-2.

Hoşer, A. (2018) *Juvenil Akselik Sakız Ağacı Eksplantlarından (Pistacia Lentiscus L.) Süspansiyon Kültürlerinin Başlatılması Ve Optimizasyonu* Yüksek Lisans Tezi, Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Batman.

İsfendiyaroğlu, M. (1999) *Sakız Ağacının (Pistacia lentiscus var. Chia Duham.) Çelikle Çoğaltılması ve Kök Oluşumunun Anatomik – Fizyolojik İncelenmesi Üzerine Araştırmalar* Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

İsfendiyaroğlu, M. (2003). Effects of Some Physical and Biochemical Factors on The Rooting of Mastic Tree (*Pistacia lentiscus* var. *chia* Duham.) Cuttings. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40, 25–32.

Keçeci, A. (2019) *Çeşme Yarımadasında Yetişen Yabani (Pistacia lentiscus L.) ve Kültür Sakızı (Pistacia lentiscus var. chia Duham.) Ağaçlarının Yapraklarındaki Uçucu Yağ Özelliklerinin Belirlenmesi* Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

Kılıç, M.U. (2019) *Sakız Ağacı, Yetiştiriciliği ve Türkiye'deki Varlığı* Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, İzmir.

Kılıç, M.U., Uysal, H. (2019, Kasım 28-30). *Sakız ağacı (Pistacia lentiscus L. var. chia) ve in vitro rejenerasyonu* [Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum]. 1. Uluslararası Genç Araştırmacılar Öğrenci Kongresi, Burdur.

Kılınç, F.M. (2013). *Sakız Ağacı (Pistacia lentiscus L.)'nin İn Vitro Klonal Mikroçoğaltılması* Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Kılınç, F.M., Süzerer, V., Özden Çiftçi, Y., Onay, A., Yıldırım, H., Uncuoğlu, A.A., ... Metin Karakaş, Ö. (2014). Clonal Micropropagation of *Pistacia lentiscus* L. and Mssessment of Genetic Stability Using IRAP Markers. *Plant Growth Regulation*, 75, 75-88.

- Kıvçak, B., Akay, S., Demirci, B., Başer, K. (2004). Chemical Composition of Essential Oils from Leaves and Twigs of *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* from Turkey. *Pharmaceutical Biology*, 42(4-5), 360-366, DOI: 10.1080/13880200490519677.
- Kishore, K., Patnaik, S., Shukla, A.K. (2015). Optimization of Method to Alleviate In Vitro Shoot Tip Necrosis in *Trichosanthes dioica* Roxb. *Indian Journal of Biotechnology*, 14, 107-111.
- Kiviharju, E., Puolimatka, M., Saastamoinen, M., Hovinen, S., Pehu, E. (1998). The Effect of Genotype on Anther Culture Response of Cultivated and Wild Oats. *Agricultural and Food Science*, 7(3), 409-422.
- Koç, İ. (2011) *Sakız Ağacının (Pistacia lentiscus) İn Vitro Koşullarda Mikroçoğaltımı ve Saklanması* Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik Ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- Kostas, S., Hatziloukas, E., Hatzilazarou, S., Economou, A.S. (2016). Efficient Vegetative Propagation of Various Clones of Mastic Tree (*Pistacia lentiscus* 'Chia') Through Rooting of Shoot Cuttings. *Acta Horticulturae*, 1242, 735-742.
- Koutsoudaki, C., Krsek, M., Rodger, A. (2005). Chemical Composition and Antibacterial Activity of The Essential Oil and The Gum of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7681-7685.
- Lavakumaran, L., Seran, T.H. (2014). Effect of 6-Benzyl-Aminopurine and Thidiazuron on In Vitro Shoot Organogenesis of *Aloe vera* (L.) Burm. f. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 74(4), 497-501.
- Lech, M., Miczynski, K., Pindel, A. (1996). Comparison of Regeneration Potentials in Tissue Cultures of Primitive and Cultivated Tomato Species (*Lycopersicon* sp.). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 65, 53-56.
- Mackay, W.A., Tipton, J.L., Thompson, G.A. (1995). Micropropagation of Mexican Redbud, *Cercis canadensis* var. *mexicana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43(3), 295-299.

- Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounid, A.L., Chinou, I.B., Mitaku, S. (1999). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of The Essential Oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Plant Medica*, 65(8), 749-752.
- Mascarello, C., Fascella, G., Zizzo, G.V., Mantovani, E., Ruffoni, B. (2007). In vitro and In vivo Propagation of *Pistacia lentiscus* L., *Acta Horticulturae*, 764, 299-306.
- Mbah, E.I., Wakil, S.M. (2012). Elimination of Bacteria from In Vitro Yam Tissue Cultures Using Antibiotics. *Journal of Plant Pathology*, 94(1), 53–58.
- Mereti, M., Grigoriadou, K., Nanos, G.D. (2002). Micropropagation of The Strawberry Tree, *Arbutus unedo* L. *Scientia Horticulturae*, 93, 143-148.
- Miyamoto, T., Okimoto, T., Kuwano, M. (2014). Chemical Composition of The Essential Oil of Mastic Gum and Their Antibacterial Activity Against Drug-Resistant *Helicobacter pylori*. *Natural Products and Bioprospecting*, 4(4), 227-231.
- Moradpour, M., Aziz, M.A., Abdullah, S.N.A. (2016). Establishment of In Vitro Culture of Rubber (*Hevea brasiliensis*) from Field-Derived Explants: Effective Role of Silver Nanoparticles in Reducing Contamination and Browning. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 7(3), doi:10.4172/2157-7439.1000375.
- Mustafa, N.S., Rania, A.T., Hassan, S.A.M., Zaid, N.S.M., Mustafa, E.A. (2013). Overcoming Phenolic Accumulation of Date Palm In Vitro Culture Using Tochoferol and Cold Pre-Treatment. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 15(3), 344-350.
- Nartop, P. (2018). Green Sterilization of *Rosmarinus officinalis* L. Stem Surfaces with Silver Nanoparticles Synthesized Using *Rubia tinctorum* L. Cell Culture Extracts. *Iranian Journal of Science and Technology*, 42, 411–414.
- Nayanakantha, N.M.C., Singh, B.R., Kumar, A. (2010). Improved Culture Medium for Micropropagation of *Aloe vera* L. *Tropical Agricultural Research and Extension*, 13(4), 87-93.
- Ohlsson, T. (1994). Minimal Processing-Preservation Methods of The Future: An Overview. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 341-344.

Onay, A. (1996). *In Vitro Organogenesis and Embryogenesis of Pistachio, Pistacia vera L.* PhD. Thesis, University of Edinburgh, Institute of Cell and Molecular Biology, Edinburgh (UK).

Onay, A., Tilkat, E., Süzerer, V., Karakaş Metin, Ö., Özden Çiftçi, Y., Kılınç, F.M., ... Akdemir, Ö.F. (2016). Rejuvenation of Mature Lentisk by Micrografting and Evaluation of Genetic Stability, *Turkish Journal of Biology*, 40, 781-796.

Onay, A., Yıldırım, H., Tilkat, E., Özden Çiftçi, Y. (2014), *Sakız Ağacının (Pistacia lentiscus L.) Juvenil ve Olgun Eksplantlarının Mikroçoğaltımı, Kriyoprezervasyonu ve Genetik Kararlılığının Belirlenmesi* Sonuç Raporu. Ankara: TÜBİTAK KBAG, Proje No: 110T941.

Orman Genel Müdürlüğü. (2020). *2019 Yılı İdare Faaliyet Raporu*. Ankara: Strateji Geliştirme Dairesi Başkanlığı. (<https://www.ogm.gov.tr/tr/faaliyet-raporu>, Yayımlanma tarihi: 9 Mart 2020).

Özyiğit, İ.İ., Kahraman, M.V., Ercan Ö. (2007). Relation Between Explant Age, Total Phenols and Regeneration Response in Tissue Cultured Cotton (*Gossypium hirsutum L.*). *African Journal of Biotechnology*, 6(1), 003-008.

Pan, M.J., Van Staden, J. (1998). The Use of Charcoal in In Vitro Culture—A review. *Plant growth regulation*, 26(3), 155-163.

Paraschos S., Mitakou S., Skaltsounis, A.L. (2012). Chios Gum Mastic: A Review of Its Biological Activities. *Current Medicinal Chemistry*, 19(14), 2292-2302.

Patel, A., Patil, G., Mankad, M., Subhash, N. (2018). Optimization of Surface Sterilization and Manipulation of In Vitro Conditions for Reduced Browning in Pomegranate (*Punica granatum L.*) variety Bhagava. *International Journal of Chemical Studies*, 6(3), 23-28.

Pekyardımcı, Ş. (1992). Polifenol Oksidaz Enzimi ve esmerleşme Reaksiyonlarının Gıda Endüstrisi Uygulamaları. *Gıda*, 17(3), 181-186.

Perez Tornero, O., Burgos, L., (2000). Different Media Requirements for Micropropagation of Apricot Cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63, 133–141.

Pericos, J. (1993). *The chios gum mastic*, Athens: Printall Ltd. ISBN 960-85009-3-1.

Rana, M.M., Han, Z.X., Song, D.P., Liu, G.F., Li, D.X., Wan, X.C., ... Wei, S. (2016). Effect of Medium Supplements on *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Hairy Root Induction from The Callus Tissues of *Camellia sinensis* var. *sinensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1132.

Rokka, V.M., Pietilä, L., Pehu, E. (1996). Enhanced Production of Dihaploid Lines via Anther Culture of Tetraploid Potato ( *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*) Clones. *American Journal of Potato Research*, 73, 1-11.

Salam, N., Awal, A., Abdullah, S. (2019). Embryogenic Callus Induction of *Aquilaira malaccensis* Lam. and *Aquilaria subintegra* Ding Hou. *International Journal of Engineering and Advanced Technology*, 9(1), 5746-5751.

Shibli, R.A., Smith, M.A.L., Nasi, R. (1997). Iron Source and Cytokinin Mitigate The Incidence of Chlorosis and Hyperhydration In Vitro, *Journal of Plant Nutrition*, 20(6), 773-781. DOI: 10.1080/01904169709365293 ISSN: 0190-4167 (Print) 1532-4087 (Online), Online Yayın Tarihi: 21 Kasım 2008.

Sıgıncı Çetin, Y. (2018) *Bazı Abiyotik Stres Uygulamalarının İn Vitro Ortamda Çoğaltılmış Juvenil Sakız Ağacı (Pistacia Lentiscus L.) Eksplantlarında Triterpenoit Miktarları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi* Yüksek Lisans Tezi, Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Batman.

Surakshitha, N.C., Soorianathasundaram, K., Ganga, M., Raveendran, M. (2019). Alleviating Shoot Tip Necrosis During In Vitro Propagation of Grape cv. Red Globe. *Scientia Horticulturae*, 248, 118-125.

Şenyay, D. (2008). *Sakız Ağacının (Pistacia lentiscus L.) İn Vitro Koşullarda Rejenerasyonu Üzerine Araştırmalar* Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Taşkın, T., İnal, A. (2005). Sakız Ağacı (*Pistacia lentiscus* var. *chia* Duhamel)'nın İn Vitro Mikroçoğaltımı Üzerine Araştırmalar. *Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 15(1), 1-14.

The Chios Mastiha Growers Association. (2005). *Typical Analysis Data of Chios Gum Mastic*, Chios, Yayınlanma tarihi: 21 Ekim 2005. <https://mastic.gr/wp-content/uploads/2018/03/Mastic-Gum-Typical-Analysis.pdf>



- Turhan Serttaş P., Özcan T. (2018). Intraspecific Variations Studied by ISSR and IRAP Markers in Mastic Tree (*Pistacia lentiscus* L.) from Turkey. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 19(2), 147-157.
- Yalçın, G. (2011). *İn Vitro'da Sakız Ağacı (Pistacia lentiscus var. chia) Eksplantlarında Görülen Kararmaların Çözümü Üzerine Araştırmalar* Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, İzmir.
- Yang, H., Zhou, C., Wu, F., Cheng J. (2010). Effect of Nitric Oxide on Browning and Lignification of Peeled Bamboo Shoots. *Postharvest Biology and Technology*, 57, 72–76.
- Yıldırım, H., Onay, A., Gündüz, K., Ercişli, S., Karaat, F.E. (2019). An Improved Micropropagation Protocol for Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.), *Folia Horticulturae*, 31(1), 61-69.
- Zhou, W., Tan, R., Xu, C., Lai, Y., Chen, D., Li, L. (2009). Giberellic Acid Inhibits Browning, Enzyme Activity and Gene Expression of Phenylalanine Ammonia-Lyase in *Phalaenopsis* Leaf Explants. *Genes, Genomes and Genomics*, 3(Special Issue 1), 68-71.
- Zohary, M. (1952). A Monographical Study of the Genus *Pistacia*. *Palestine Journal of Botany*, Jerusalem Series, 5, 187-228.
- Zrira, S., Elamrani, A., Benjilali, B. (2003). Chemical Composition of The Essential Oil of *Pistacia lentiscus* L. from Morocco-A Seasonal Variation. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 475-480.
- Webb, D.T., Flinn, B.S., Georgis, W. (1988). Micropropagation of Eastern White Pine (*Pinus strobus* L.). *Canadian Journal of Forest Research*, 18: 1570-1580.

# BİLİMSEL ETİK BEYANI

T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“FARKLI SAKIZ AĞACI (*Pistacia lentiscus* L.) GENOTİPLERİNE AİT SÜRGÜN UCU EKSPLANTLARINDA İN VİTRO KÜLTÜRLERİN BAŞLATILMASI VE MİKROÇOĞALTIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI” başlıklı yüksek lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Mazlum Umut Kılıç

... / ... / ...